

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**UNIDAD DE POSTGRADO**

**Control biológico e interacción de baculovirus PoGV, y  
Bacillus thuringiensis var Kurstaki sobre polilla de la  
papa:**

*Phthorimaea operculella* (Zeller) y *Symmetrischema tangolias*  
(Gyen) [Lepidoptera: Gelechiidae]

**TESIS**

para optar al grado académico de Magíster en Biotecnología

**AUTOR**

Dante Mamani Sairitupac

**Lima-Perú**

**2008**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR  
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**

Siendo las 12.00 m. del 04 de febrero del 2009 se reunieron en el Auditorio de la Unidad de Post-Grado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador de Sustentación de la Tesis, presidido por el Mg. José Juárez Eyzaguirre e integrado por los siguientes miembros: Mg. Mirtha Roque Alcarraz, Mg. Víctor Crispín Pérez, Mg. Raúl Soria López y Mg. Fernando Merino Rafael; para la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada: "CONTROL BIOLÓGICO E INTERACCIÓN DE baculovirus *PoGV*, y *Bacillus thuringiensis* var *Kurstaki* SOBRE POLILLA DE LA PAPA: *Phthorimaea operculella* (Zeller) y *Symmetrischema tangolias* (Gyen) [Lepidoptera: Gelechiidae]", del Bachiller en Ciencias Biológicas DANTE MAMANI SAIRITUPAC, de la Maestría en Biotecnología.

Acto seguido se procedió a la exposición de la Tesis, con el fin de optar al Grado Académico de Magister en Biotecnología. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado Examinador de Sustentación de la Tesis procedió a la votación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

*Sobresaliente con recomendación de publicación (A)*

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Ciencias Biológicas, DANTE MAMANI SAIRITUPAC, el Grado Académico de Magister en Biotecnología.

Siendo las *13:40* hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las *13:40* hrs. del 04 de febrero del 2009.

*[Signature]*  
Mg. José Juárez Eyzaguirre (P.P., T.C.)  
Presidente

*[Signature]*  
Mg. Mirtha Roque Alcarraz (P.Aux., T.C.)  
Miembro

*[Signature]*  
Mg. Víctor Crispín Pérez (P.P., T.P.)  
Miembro

*[Signature]*  
Mg. Raúl Soria López (P.P., T.C.)  
Miembro

*[Signature]*  
Mg. Fernando Merino Rafael (P.P., D.E.)  
Miembro

**Observaciones:**

### **JURADO EXAMINADOR**

Mg. José Juárez Eyzaguirre	PRESIDENTE
Mg. Raúl Soria López	MIEMBRO
Mg. Mirtha Roque Alcarraz	MIEMBRO
Mg. Víctor Crispín Pérez	MIEMBRO
Mg. Fernando Merino Rafael	MIEMBRO

**ASESORES DE TESIS**

**Dr. Marc Sporleder**

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA

ASESOR EXTERNO

**Mg. Fernando Merino Rafael**

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

ASESOR INTERNO

## **DEDICATORIA**

### ***A DIOS:***

*Mi gran Amor, por mantener su luz en mí camino y haberme dado la bendición de hacer realidad este anhelo.*

### ***A MIS AMADÍSIMOS PADRES:***

*HERMÓGENES y MARÍA, por su incesante apoyo, su amor de padres. A ellos mi cariño, respeto, y gratitud por siempre.*

### ***A MI FAMILIA:***

*Mis hermanos AMELIA, DAVID, YENNY; sobrinos: JUAN CARLOS, KENNET y KATHERINE; mis abuelos: FRANCISCO, SANTOS y desde el cielo THOMÁS Y PRESENTACIÓN, por su aliento, apoyo permanente y oraciones.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Centro Internacional de la Papa (CIP – La Molina), la División de Protección de Cultivos por haberme acogido como Becario Tesista, su patrocinio y facilidades brindadas en la ejecución del presente trabajo de investigación.

El más especial agradecimiento y reconocimiento al Dr. Marc Sporleder (CIP), por su trabajo como Asesor Externo, su amistad, sus enseñanzas, su guía permanente, sus consejos y paciencia inagotable en la ejecución y culminación de este estudio.

A Octavio Zegarra (CIP) por su amistad enorme, sus enseñanzas, su apoyo constante, todo su tiempo compartido.

Al Dr. Jürgen Kroschel, jefe del Área de Entomología (CIP), a su equipo de investigadores conformado por Jesús Alcázar, Verónica Cañedo, Norma Mujica, por sus valiosas sugerencias durante la ejecución de este estudio.

Al Mg. Fernando Merino Rafael (UNMSM) por su enseñanza, recomendaciones y acompañamiento en calidad de Asesor Interno.

A Mónica Blanco y Sonia Santiváñez (CIP), por su colaboración en la gestión de requerimientos logísticos para la realización de la presente investigación.

Al personal técnico del área de Entomología de la División de Protección de Cultivos (CIP) Antonio Trillo y Carlos Egúzquiza por arduas jornadas de trabajo y su involucramiento en este trabajo, junto a ellos el valioso aporte de Francisco Ochoa, Marcelo Trebejo, Carlos Mendoza, Jesús Gonzáles y Heber Laurente.

Mi reconocimiento a quienes durante la ejecución del trabajo formaron parte del equipo de becarios tesistas: Vilma Hualla, Jessyca Salazar, Sandy, Erica López, Gonzalo Aldana, por su acompañamiento en tantas jornadas de trabajo. Una especial mención a Daniel Chávez por su participación en la programación del modelo Probit.

Al Señor Sotero Loza, por su acogida familiar y el invalorable apoyo durante la realización de mis estudios de maestría y ejecución de este trabajo.

**Blgo. DANTE MAMANI SAIRITUPAC**  
C.B.P. 3843  
E-mail: **dante.ms@gmail.com**

## INDICE

RESUMEN.....	15
SUMMARY .....	16
INTRODUCCIÓN .....	18
I     PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO.....	19
1.1.PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN .....	19
1.2.OBJETIVOS DEL ESTUDIO .....	20
1.3.JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA .....	21
II    MARCO TEÓRICO.....	23
2.1.ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	23
2.2.CONCEPTOS BÁSICOS .....	26
2.3.TEORÍAS BÁSICAS.....	37
2.4.HIPÓTESIS.....	40
III   PARTE EXPERIMENTAL .....	41
3.1.TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN .....	41
3.2.MÉTODO Y DISEÑO.....	41
3.3.POBLACIÓN Y MUESTRA.....	42
3.4.VARIABLES DE ESTUDIO.....	42
3.5.LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DE LOS LUGARES DE ESTUDIO .....	43
3.6.TÉCNICAS E INSTRUMENTOS.....	44
3.6.1.   Material Biológico.....	44
3.6.2.   Materiales Inertes .....	45
3.6.3.   Obtención de población de larvas neonatales de <i>Phthorimaea operculella</i> (Zeller) Y <i>Symmetrischema tangolias</i> (Gyen).....	45
3.6.4.   Proceso de bioensayos .....	46
3.6.5.   Bioensayos de actividad biológica de <i>PoGV</i> y <i>Btk</i> en suspensión acuosa sobre <i>P. operculella</i> y <i>S. tangolias</i> .....	47
3.6.6.   Bioensayos con materiales inertes.....	50
3.6.7.   Bioensayos con fórmulas de <i>PoGV</i> y <i>Btk</i> en material inerte .....	52
3.6.8.   Interacción <i>PoGV</i> – <i>Btk</i> sobre <i>P. operculella</i> .....	55
3.6.9.   Experimento en almacenes de papa.....	56
3.6.10.  Técnicas para el procesamiento de datos.....	58
IV   RESULTADOS.....	60

4.1.MORTALIDAD NATURAL DE <i>P. operculella</i> Y <i>S. tangolias</i> EN LOS	
BIOENSAYOS .....	60
4.2.ACTIVIDAD DE PATÓGENOS, APLICADOS EN SUSPENSIÓN ACUOSA A	
TUBÉRCULOS DE PAPA, SOBRE <i>P. operculella</i> Y <i>S. tangolias</i> .....	61
4.2.1. Actividad de <i>PoGV</i> sobre <i>P. operculella</i> .....	61
4.2.2. Actividad de <i>Btk</i> sobre <i>P. operculella</i> .....	61
4.2.3. Actividad de <i>Btk</i> sobre <i>S. tangolias</i> .....	62
4.3.ACTIVIDAD DE MATERIALES INERTES, APLICADOS A TUBÉRCULOS DE	
PAPA, SOBRE <i>P. operculella</i> Y <i>S. tangolias</i> .....	63
4.3.1. Actividad de talco, caolín, cal y arena sobre <i>P. operculella</i> y <i>S. tangolias</i> .....	63
4.3.2. Comparación de la actividad de aplicaciones con materiales inertes a dosis constante y según tipo de inoculación, sobre larvas de <i>P. operculella</i> y <i>S.</i> <i>tangolias</i> .....	65
4.4.ACTIVIDAD DE FÓRMULAS DE <i>PoGV</i> Y <i>Btk</i> EN POLVO .....	66
4.4.1. Actividad de <i>PoGV</i> formulado en talco y polvo de arena sobre <i>P. operculella</i> ..	66
4.4.2. Actividad de <i>Btk</i> formulado en talco sobre <i>P. operculella</i> y <i>S. tangolias</i> .....	67
4.4.3. Actividad de <i>Btk</i> formulado en polvo de arena sobre <i>P. operculella</i> y <i>S.</i> <i>tangolias</i> .....	68
4.5.INTERACCIÓN DE <i>Btk</i> y <i>PoGV</i> en <i>P. operculella</i> .....	69
4.6.EXPERIMENTOS EN ALMACENES RURALES .....	71
V DISCUSIÓN .....	73
VI CONCLUSIONES .....	97
VII RECOMENDACIONES .....	98
VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
IX ANEXOS .....	115



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mortalidad natural en larvas de <i>P. operculella</i> .....	115
Tabla 2. Mortalidad natural en larvas de <i>S. tangolias</i> .....	116
Tabla 3. Relación entre mortalidad Probit de larvas de <i>P. operculella</i> y concentración de <i>PoGV</i> aplicado por inmersión de tubérculos de papa en suspensión acuosa. ....	117
Tabla 4. Relación entre mortalidad CLL de larvas de <i>P. operculella</i> y concentración de <i>Btk</i> aplicado por inmersión de tubérculos de papa en suspensión acuosa. ....	119
Tabla 5. Relación entre mortalidad CLL de larvas de <i>S. tangolias</i> y concentración de <i>Btk</i> aplicado por inmersión de tubérculos de papa en suspensión acuosa.....	121
Tabla 6. Relación entre mortalidad Probit de larvas de <i>P. operculella</i> y <i>S. tangolias</i> respecto a la dosis de talco.....	123
Tabla 7. Relación entre mortalidad Probit de larvas neonatas de <i>P. operculella</i> y <i>S. tangolias</i> respecto a la dosis de caolín.....	125
Tabla 8. Relación entre mortalidad Probit de larvas de <i>P. operculella</i> y <i>S. tangolias</i> respecto a la dosis de cal.....	127
Tabla 9. Relación entre mortalidad Probit de larvas de <i>P. operculella</i> y <i>S. tangolias</i> respecto a la dosis de arena.....	129
Tabla 10. Mortalidad larval de <i>P. operculella</i> y <i>S. tangolias</i> , expuestas e inoculadas en estadio de huevo y larva neonatal sobre tubérculos de papa tratados con materiales inertes en una dosis de 5 g por kg. ....	131
Tabla 11. Relación entre mortalidad Probit de larvas de <i>P. operculella</i> y concentración de <i>PoGV</i> en fórmulas en talco y polvo de arena. ....	133
Tabla 12. Relación entre mortalidad CLL de larvas de <i>P. operculella</i> y <i>S. tangolias</i> y concentración de <i>Btk</i> en fórmula en talco.....	135
Tabla 13. Relación entre mortalidad Probit de larvas de <i>P. operculella</i> y <i>S. tangolias</i> y concentración de <i>Btk</i> en fórmula en polvo de arena. ....	137
Tabla 14. Interacción entre <i>Btk</i> y <i>PoGV</i> sobre larvas de <i>P. operculella</i> inoculadas en estadio de larva neonatal (experimento 1). ....	139
Tabla 15. Interacción entre <i>Btk</i> y <i>PoGV</i> sobre larvas de <i>P. operculella</i> inoculadas en estadio de larva neonatal (experimento 2). ....	140
Tabla 16. Coeficientes de regresión obtenidos entre las concentraciones letales ( $CL_x$ ) de <i>PoGV</i> y <i>Btk</i> en aplicaciones mixtas como variable independiente y valores-z obtenidos comparando respuestas de mortalidad observadas y esperadas de	

larvas de <i>P. operculella</i> asumiendo interacción independiente de ambos patógenos. ....	141
Tabla 17. Supervivencia de larvas de <i>P. operculella</i> y <i>S. tangolias</i> inoculadas en estadio de larva neonatal sobre tubérculos tratados con fórmulas de <i>Btk</i> + <i>PoGV</i> y <i>Btk</i> en polvo.....	144
Tabla 18. Coeficientes de regresión para la curva de incremento exponencial entre el número de individuos de <i>S. tangolias</i> observados y tiempo de almacenamiento en 15 almacenes de productores de papa. ....	145

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	La papa.....	27
Figura 2.	Distribución mundial de <i>P. operculella</i> .....	28
Figura 3.	Ciclo biológico de la polilla de la papa <i>Phthorimaea operculella</i> . ....	29
Figura 4.	Ciclo de vida de la polilla andina de la papa, <i>Symmetrischema tangolias</i> . ....	31
Figura 6.	Ciclo vital y modo de acción de baculovirus. (Adaptado de OECD, 2002).....	34
Figura 7.	Mecanismo de acción de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Adaptado de IPCS, 1999). ....	36
Figura 8.	Curvas de mortalidad y línea de regresión Probit en larvas de <i>P. operculella</i> expuestas a <i>PoGV</i> , aplicado en suspensión acuosa sobre tubérculos de papa.. ....	118
Figura 9.	Curvas de mortalidad y línea de regresión CLL en larvas de <i>P. operculella</i> expuestas a <i>Btk</i> , aplicado en suspensión acuosa sobre tubérculos de papa.. ....	120
Figura 10.	Curvas de mortalidad y línea de regresión CLL de larvas de <i>S. tangolias</i> expuestas a <i>Btk</i> aplicado en suspensión acuosa sobre tubérculos de papa.. ....	122
Figura 11.	Curvas de mortalidad y regresión Probit de larvas de <i>P. operculella</i> y <i>S. tangolias</i> debido a tubérculos de papa tratados con diferentes dosis de talco.....	124
Figura 12.	Curvas de mortalidad y regresión Probit de larvas de <i>P. operculella</i> y <i>S. tangolias</i> debido a tubérculos de papa tratados con diferentes dosis de caolín.....	126
Figura 13.	Curvas de mortalidad y regresión Probit de larvas de <i>P. operculella</i> y <i>S. tangolias</i> debido a tubérculos de papa tratados con diferentes dosis de cal.....	128
Figura 14.	Curvas de mortalidad y regresión Probit de larvas de <i>P. operculella</i> y <i>S. tangolias</i> debido a tubérculos de papa tratados con diferentes dosis de arena.....	130
Figura 15.	Comparación de mortalidad de larvas de <i>P. operculella</i> y <i>S. tangolias</i> inoculadas y expuestas en estadio de larva neonatal y huevo sobre tubérculos de papa tratados con diferentes materiales inertes en una dosis de 5 g por kg.....	132
Figura 16.	Curvas de mortalidad y regresión Probit en larvas de <i>P. operculella</i> debido a tubérculos de papa tratados con fórmulas de <i>PoGV</i> en talco y arena.. ....	134
Figura 17.	Curvas respuesta de mortalidad para larvas de <i>P. operculella</i> y <i>S. tangolias</i> debido a tubérculos de papa tratados con fórmulas de <i>Btk</i> (DiPel 2X) en talco.. ....	136
Figura 18.	Curvas de mortalidad y regresión Probit en larvas de <i>P. operculella</i> y <i>S. tangolias</i> debido a <i>Btk</i> formulado en polvo de arena.. ....	138

Figura 19. Regresión múltiple entre el logaritmo de las concentraciones de <i>PoGV</i> (gránulos/mL) y <i>Btk</i> (mg DiPel 2X/litro) como variables independientes en aplicaciones mixtas y los valores $z$ ..	142
Figura 20. Regresión múltiple entre concentraciones letales ( $CL_x$ ) de <i>PoGV</i> y <i>Btk</i> en aplicaciones mixtas como variables independientes y valores $z$ ..	143
Figura 21. Incremento de infestación promedio por <i>S. tangolias</i> durante tiempo de almacenamiento de tubérculos de papa tratados con fórmulas individuales de <i>Btk</i> y combinadas de <i>PoGV</i> y <i>Btk</i> en talco..	146

## ABREVIATURAS

AGROICA	: Portal Agrario del Gobierno Regional Ica – Perú
AIC	: Criterios de Información Akaike
ANOVA	: Análisis de varianza
ANCOVA	: Análisis de covarianza
BVs	: Virus desnudos (buded viruses)
<i>Bt</i>	: <i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Btk</i>	: <i>Bacillus thuringiensis</i> variedad <i>Kurstaki</i>
CATIE	: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
CIP	: Centro Internacional de la Papa
CLL	: Complementary Log Log
CL <sub>50</sub>	: Concentración letal media
CONAMA	: Concejo Nacional del Medio Ambiente
cv	: cultivar
ES	: Error estándar
DE	: Desviación estándar
DDT	: Diclorodifeniltricloroetano
DiPel 2X	: Producto comercial con principios activos de <i>Bacillus thuringiensis</i>
DL <sub>50</sub>	: Dosis letal media
DNA	: Ácido Desoxiribonucleico
dsDNA	: Ácido Desoxiribonucleico de doble cadena
FONTAGRO	: Fondo Regional de Tecnologías Agropecuarias
g	: gramo
<i>g</i>	: gravedad
GV	: granulovirus
HR	: humedad relativa
IC <sub>95%</sub>	: 95% de Intervalo de confianza
ICP	: Insecticidal Cristal Proteins, delta endotoxinas
ICTV	: Comité Internacional de Taxonomía de Virus
INIAP	: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias
IPCS	: International Programme on Chemical Safety
IPM	: Integrated Pest Managment
IRD	: Instituto Francés de Investigación para el Desarrollo

kDa	: kilo daltons
L	: litro
ln	: logaritmo natural
L <sub>1</sub>	: larvas de primer estadio, larvas neonatales
MINAG	: Ministerio de Agricultura
MNPV	: Multiple Nuclear Polyhedroviruses
mL	: mililitro
ml	: mililitro
NPV	: nucleopolihedrovirus
NCs	: nucleocápsides
OB	: cuerpo de oclusión (occlusion bodies)
ODV	: virus derivados de los cuerpos de oclusión (occlusion derived viruses)
OECD	: Organisation for Economic Co-operation and Development
pH	: potencial de hidrogeniones
<i>Po</i>	: <i>Phthorimaea operculella</i>
<i>PoGV</i>	: <i>Phthorimaea operculella</i> granulovirus
PROINPA	: Fundación para la Promoción e Investigación de Productos Andinos
PTM	: Polilla de la papa (Potato Tuber Moth)
PUCE	: Pontificia Universidad Católica del Ecuador
<i>St</i>	: <i>Symmetrischema tangolias</i>
SNPV	: Single Nuclear Polyhedroviruses
T	: temperatura
TM	: tonelada métrica
UI	: Unidades Internacionales de Potencia.
μm	: micrómetros
USA	: Estados Unidos de América (United States of America)
\$US	: dólares americanos
Ø	: diámetro de grosor

## RESUMEN

En las zonas productoras de papa (*Solanum tuberosum* Linneo) del Perú, una especie de polilla de la papa (PTM): *Symmetrischema tangolias* Gyen (Lepidoptera: Gelechiidae) viene desplazando en predominancia a *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera: Gelechiidae). El objetivo de esta investigación fue desarrollar una fórmula bioinsecticida eficaz contra ambas plagas, basado en *PoGV*, *Btk* o la combinación de ambos. El tratamiento de tubérculos de papa (cv. “Peruanita”) con fórmulas de patógenos fue por inmersión o impregnación; e inoculadas con larvas neonatales de ambas especies. Los bioensayos se desarrollaron a: 25°C (*P. operculella*), 20°C (*S. tangolias*) y condiciones naturales en almacenes de papa. Las fórmulas en talco mejoraron la eficacia de los patógenos, alcanzando niveles  $CL_{50}$  con menores concentraciones de *PoGV* (16 veces) y *Btk* (5-6 veces) al compararse con sus respectivas aplicaciones acuosas ( $1,55 \times 10^7$  gránulos/mL;  $IC_{95\%}$ :  $1,26 \times 10^7$ - $2,14 \times 10^7$  y 1321 mg/L;  $IC_{95\%}$ : 1084-1555) obtenidas contra *P. operculella*; así mismo fueron 2-4 veces menores respecto a aplicaciones acuosas de *Btk* (3095 mg/L;  $IC_{95\%}$  1711 - 3575) en *S. tangolias*. La interacción *PoGV*-*Btk* contra *P. operculella* fue mixta, tendiendo al antagonismo ante concentraciones altas de ambos patógenos y sinérgicos a bajas concentraciones. Dos fórmulas: *Btk* y *Btk*+*PoGV*, desarrollados y aplicados en almacenes de papa, permitieron incrementos poblacionales, 90 días después, solo en *S. tangolias* (3,0 y 2,7%) (larvas-pupas/100 tubérculos); luego de disminuirlos a niveles de 1,7% (30 días). No resulta conveniente utilizar fórmulas combinadas de *Btk*+*PoGV* por no conseguirse sinérgismos importantes; recomendándose el producto *Btk* en talco, por su efectividad contra ambas especies de PTM.

## SUMMARY

In the areas of potato productions (*Solanum tuberosum* Linneo) from Peru, a species of potato tuber moth (PTM): *Symmetrischema tangolias* Gyen (Lepidoptera: Gelechiidae) it comes displacing in predominance to *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera: Gelechiidae). The objective of this investigation was to develop an effective bioinsecticide formule against both pests, based on *PoGV*, *Btk* or the combination of both. The treatment of the potato tubers (cv. “Peruanita”) was realized by immersion when was used one solution formulated or by covers when the powder formulation was, over, which was, inoculated the neonatal larvae. The laboratory bioassays were developed at control condition 25°C (*P. operculella*), 20°C (*S. tangolias*) and at room condition for the potato storage. Due the effects of some inert material over the mortality, the talcum formulation of both pathogens tested showed better efficacy than aqueous solution formulated. Reaching the CL<sub>50</sub> level using less concentration of *PoGV* (16 times) and *Btk* (5 to 6 times) in comparison with the respective aqueous applications (1,55×10<sup>7</sup> granules/mL; IC<sub>95</sub>%: 1,26×10<sup>7</sup>- 2,14×10<sup>7</sup> and 1321 mg/L; IC<sub>95</sub>%: 1084-1555) against *P. operculella*. The difference was 2 to 4 time minor in *S. tangolias* concerning aqueous applications of *Btk* (3095 mg/L; IC<sub>95</sub>% 1711-3575). The *PoGV-Btk* interaction against *P. operculella* results mixed, reaching to the antagonism in front of high concentrations of both pathogens and synergistic to low concentrations. Two formulations: *Btk* and *Btk+PoGV* was developed and applied in potato storage, permitting increments populations 90 days later, only in *S. tangolias* (3,0 2,7%) (larvae and pupae/100 tubers), then of diminishing them to levels of 1,7% (30 days). With this results is not recommended the use formulations combined of *Btk+PoGV* by not getting important synergism; recommending the use of the talcum *Btk* product, for their high affectivity against both species of potato tuber moth.



**Palabras clave:**

Control biológico, *Phthorimaea operculella*, *Zymmetrischema tangolias*, polilla de la papa (PTM), *PoGV*, *Btk*, *Bacillus thuringiensis*, interacción entre patógenos.

## INTRODUCCIÓN

El manejo de plagas y enfermedades en sistemas de agricultura ecológica se basan en el uso de productos fitosanitarios no sintéticos, los cuales incluyen productos botánicos, agentes biológicos como parasitoides y depredadores, agentes microbianos como hongos, bacterias y virus entomopatógenos y antagonistas para manejo de problemas de patógenos de las plantas (CATIE, 2002). Los Entomopatógenos tienen potencial en programas de control microbiano (STEINHAUS, 1956) y muchos se han explotado en control de plagas agrícolas y forestales (LACEY Y GOETTEL, 1995). En las zonas tropicales hay una gran biodiversidad de agentes microbianos que tienen potencial para el control natural de las plagas y enfermedades que pueden ser explotados, optimizando las técnicas para su producción y utilización (CATIE, 2002).

Entre las principales plagas de cultivos de papa (*Solanum tuberosum* Linneo) en el Perú, están las “polillas de la papa” *Phthorimaea operculella* (Zeller), y *Symmetrischema tangolias* (Gyen) (Lepidoptera: Gelechiidae), cuyas larvas barrenan brotes y tallos, minan las hojas y atacan los tubérculos; siendo *P. operculella* la plaga de mayor importancia económica y distribución, ocasionando hasta el 50% de daño en campo y 100% de daño en almacén cuando no se hace un adecuado control (CIP, 1983). *Phthorimaea operculella*, es una de las plagas que causan mayor daño a cultivos y almacenes de papa, especialmente en zonas de climas cálidos y secos. Sus larvas se desarrollan en el follaje y tubérculos de papa, causando pérdidas comerciales (LARRAÍN, 2004); en tanto, *S. tangolias* ha incrementado su importancia en los últimos años como insecto plaga principalmente en la región andina del continente americano: Bolivia (PROINPA, 1999), Colombia (CIP, 1988) y últimamente en el Perú (CIP, 1988; SÁNCHEZ y AQUINO, 1986). La producción de papa en el mercado común andino representa actualmente 7,8 millones de toneladas al año en aproximadamente 640 000 hectáreas (FAOSTAT, 2006). Se estimó que los daños económicos pueden llegar a causar pérdidas de hasta US\$ 500/ha al año (FONTAGRO, 2006). Para el control de *P. operculella* en almacén se ha recomendado la aplicación de una estrategia de manejo integrado en la cual el control biológico mediante el uso de granulovirus *PoGV* es un componente clave (CIP, 1992); siendo esta estrategia inefectiva contra *S. tangolias*.

## I PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

### 1.1. PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

Entre las principales plagas que afectan la producción de tubérculos-semillas se encuentran las polillas de la papa cuyas larvas ingresan al tubérculo para alimentarse y hacen túneles durante su desarrollo. En este proceso los tubérculos se hacen inservibles para su consumo y su conservación como semilla; el daño puede afectar hasta el 100% de los tubérculos en campo y almacén. Tres son las especies pertenecientes a la familia *Gelichiidae* presentes en Sudamérica: *Phthorimaea operculella* (Zeller), *Tecia solanivora* (Povolny) y *Symmetrischema tangolias* (Gyen). *P. operculella* es la especie de más amplia distribución a nivel mundial; se le encuentra en todas las zonas de producción de papa en América, Europa, África, Asia y Australia, es típica de zonas cálidas, pero también se le encuentra en zonas altas, como en el área andina; en el Perú se le encuentra desde 0 a 4,000 msnm, daña la parte aérea de la planta (brotes, hojas y tallos) y los tubérculos en campo y en almacén. *T. solanivora* es originaria de Guatemala; se le encuentra en Centroamérica, Venezuela, Colombia y Ecuador desde los 2,000 a 3,400 msnm, daña los tubérculos en campo y almacén. *S. tangolias* es una especie típica del área andina y se le encuentra en Perú, Bolivia y Colombia, desde los 2,000 a 3500 msnm, daña la parte aérea de la planta (tallos) y los tubérculos en el campo y el almacén (PALACIOS 1997).

Las polillas se constituyen en un gran problema para los pequeños, medianos y grandes agricultores. Su incidencia de daño causado está directamente relacionado a factores climáticos (altas temperaturas, sequías), manejo del cultivo en campo (deficientes labores culturales), manejo de post cosecha (almacenamiento inadecuado). Las pérdidas causadas por esta plaga han afectado muchas veces más del 50% del material cosechado o almacenado (PALACIOS 1998). Uno de los problemas más serios derivados de la alta incidencia de esta plaga es el uso inadecuado de insecticidas en el campo como en el almacén, lo que ha ocasionado numerosos

casos de intoxicación. Una de las causas de los problemas arriba mencionados es el hecho de que el agricultor conoce muy poco sobre esta plaga, no reconoce las especies, no conoce sus ciclos de vida, ni su comportamiento, razones por las cuales no se puede mejorar sus métodos de control.

Hasta la actualidad se ha venido empleando un producto de *PoGV* formulado en talco para el control de poblaciones de *P. operculella* en almacén, sin embargo debido a la ineficacia de este producto sobre *S. tangolias*, una especie que viene desplazando en importancia a la especie tradicional, existe entonces la necesidad de encontrar un producto eficaz también contra *S. tangolias*

## **1.2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO**

### **- Objetivo general.**

Desarrollar una fórmula bioinsecticida contra *Phthorimaea operculella* y *Symmetrischema tangolias*, basado en *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* (*Btk*) o la combinación con granulovirus *PoGV* como alternativa a los insecticidas químicos usados en almacenes de papa.

### **- Objetivos específicos.**

(a) Determinar la actividad biológica ( $CL_{50}$ ) de *PoGV* y *Btk*, y su interacción en aplicaciones combinadas de ambos patógenos sobre *P. operculella*, (b) determinar la actividad biológica ( $CL_{50}$ ) de *Btk* sobre *S. tangolias*, (c) determinar la actividad biológica sobre larvas de *P. operculella* y *S. tangolias* de materiales inertes ( $DL_{50}$ ) como talco, caolín, cal, polvo de arena y fórmulas en polvo de *PoGV* y *Btk* ( $CL_{50}$ ) aplicados a tubérculos de papa, (d) determinar la actividad biológica de fórmulas en polvo de estos entomopatógenos en almacenes de productores de papa sobre ambas poblaciones de polilla de la papa.

### **1.3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA**

Las larvas de la polilla dañan los tubérculos en campo y almacén; estos se hacen amargos e inservibles para consumo o semilla. Por esta razón la estrategia de control está orientada a mantener la plaga en poblaciones bajas, prevenir el daño y evitar la migración de la plaga del campo al almacén y del almacén al campo. Un programa de estrategias integra medidas de control cultural, etológico, biológico y químico (PALACIOS 1997). El presente estudio esta orientado a un control biológico en almacén.

Hoy en día la papa constituye un alimento fundamental en la dieta del hombre, cuya importancia se manifiesta en estadísticas nacionales, que reportan su cultivo en 19 departamentos desde el nivel del mar hasta los 4500 msnm. La producción en el Perú según el portal agrario del Gobierno Regional de Ancash, citando como fuente la FAO, es de 3 299 159 toneladas producidas en 271 185 ha, con un rendimiento de 121 657 kg/ha. Representa el 13% del PBI agrícola, siendo el más alto índice que cualquier otro cultivo alimenticio nacional, con un dinámico incremento de producción desde el año 2001 al 2007, y un rendimiento promedio de 12 TM/Ha, y un precio promedio de productor al 2007 de S/. 0,49 Nuevos Soles por kilogramo (AGROANCASH, 2008). Según el MINAG (2008) la producción de papa crecerá 5% en el 2008 y sumará 3,5 millones de toneladas.

Para disminuir el daño ocasionado por la polilla de la papa; los agricultores realizan aplicación de insecticidas químicos (Folidol, Malathion, DDT, Phostoxin) en condiciones altamente riesgosas para la salud; y almacenan los tubérculos-semillas en sus viviendas quedando directa o indirectamente expuestas a la acción de las plagas, Aplicando también algún método de control tradicional como el uso de ceniza o plantas repelentes, con baja eficiencia de control.

Con la finalidad de conseguir un conocimiento más amplio de la actividad biológica de los entomopatógenos en estudio, así como su posible interacción favorable en la potencialización

de actividad biológica contra *P. operculella* y *S. tangolias* y conseguir entonces un control más eficaz de estas poblaciones de insectos plaga en los almacenes de papa, es que se realiza ésta investigación. Su importancia radica finalmente en producir un bioinsecticida formulado en polvo que sea capaz de controlar ambas especies de polillas de la papa y que sea aplicable en la protección de tubérculos en almacenes de papa en las zonas de producción y controlar de esta manera el incremento de poblaciones de polilla de la papa a nivel de almacén, disminuyendo además los daños producidos en los tubérculos; como resultado de la aplicación de un producto formulado como el que se busca producir, se derivará entonces la mejoría en los ingresos económicos de los productores.

## II MARCO TEÓRICO

### 2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Uno de los cultivos ancestrales y de gran riqueza genética en nuestro país es la papa (*Solanum tuberosum* L.), el mismo que ha formado parte de la alimentación cotidiana de los pobladores desde épocas prehispánicas. Se cultiva en los valles intermedios y los Andes, su producción se destina principalmente al autoconsumo, al mercado y conservación como semilla.

El papel del control microbiano en la protección de cultivos y bosques, y la disminución de insectos de importancia médica y veterinaria, se ha expandido con el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes de control microbiano. Por su selectividad y mínimo impacto ambiental, los organismos entomopatógenos pueden ser componentes ideales en programas de manejo integrado de plagas desde principios del siglo pasado (LACEY y GOETTEL, 1995).

La estrategia de control de las plagas en este cultivo está basada en el conocimiento de la biología e identificación de las principales plagas, en el uso y combinación de distintas prácticas para disminuir la población de insectos y en la búsqueda de alternativas de control con énfasis en medidas culturales y medios mecánicos o físicos que eviten el uso indiscriminado de insecticidas tóxicos (ALCÁZAR, 2000), incluso ventajosos. Por ejemplo una sola aplicación de *PoGV* puede ser equivalente en control a 8 – 10 aplicaciones de insecticidas químicos (SMITH, 1975).

Los baculovirus comprenden el mayor grupo de virus de insectos. Estos virus tienen gran potencial como agentes de control biológico de insectos plagas en agricultura en áreas forestales (MARTIGNONI, 1984; PAYNE, 1986; MOSCARDI y SOSA-GÓMEZ, 1992, 1993; MOSCARDI, 1998). Son específicos a una o pocas especies relacionadas (GRÖNER, 1986), y su protección en cristales proteicos permite la fórmula de bioinsecticidas con fácil tecnología de aplicación, representando economía y bioseguridad con relación a los insecticidas químicos.

Los baculovirus han sido estudiados como agentes de control biológico desde a década de 60 (PAYNE, 1986). Debido a su alta especificidad y ocurrencia natural, los baculovirus son óptimos candidatos a ser usados en programas de manejo integrado de plagas (MOSCARDI, 1990; FUNDERBURK *et al.*, 1992; TANADA Y KAYA, 1993), pues en diversas pruebas de seguridad se ha establecido que el virus es inofensivo a microorganismos, otros invertebrados (excepto algunos insectos), vertebrados y plantas (PAYNE, 1986; GRÖNER, 1989).

Del mismo modo que la mayoría de baculovirus, *PoGV* tiene un rango específico de hospederos. Solamente *P. operculella* y ciertas especies en la misma familia (Gelechiidae) son infectados por este virus. *Scrobipalpaloides (Tuta) absoluta* y *Tecia solanivora* son susceptibles a *PoGV*, pero en niveles inferiores que *P. operculella* (ÁNGELES Y ALCÁZAR, 1995, 1996; ZEDDAM *et al.*, 2003). Aunque *PoGV* podría ser aislado a partir de *S. tangolias* este no parece afectarla (J. KROSCHER, comunicación personal). LACEY Y ARTHURS, 2006; POKHARKAR Y KURHADE (1999) reportaron no infectividad a otras 11 especies de lepidópteros.

*Bacillus thuringiensis (Bt)* es otro de los entomopatógenos que puede aplicarse para el control de poblaciones de polilla de la papa, en aspersiones o en espolvoreo. El *Bt* reduce significativamente el daño del tubérculo causado por *P. operculella* y la pudrición subsiguiente cuando se asperjan los tubérculos antes del almacenamiento con una solución de Dipel al 0,5% (ORTEGA, 1995). La aplicación antes del almacenamiento con la fórmula de este producto en dosis de 3 a 4 kg por tonelada de papa también es un efectivo control. De la evaluación de *B. thuringiensis* en tres métodos (aspersión, inmersión y espolvoreo), el mejor resultado se obtuvo en almacén con el espolvoreo (6% de daños), resultando la inmersión inefectiva (27% de daños (ORTEGA Y FERNÁNDEZ, 2000). En el mercado existen diferentes productos bioinsecticidas a base de *Bt*, y se ha señalado que su alto costo y baja estabilidad en el campo son sus mayores limitaciones para el uso a gran escala (ORTEGA Y FERNÁNDEZ, 2000). En los



almacenes los tubérculos, sobre todo los destinados a semilla, deben ser tratados con productos biológicos formulados en polvo como *B. thuringiensis* o baculovirus (CIP, 1996).

La polilla de la papa *Symmetrischema tangolias* es una especie que ha adquirido mucha importancia en los últimos años debido a su rápida dispersión. Los daños causados por esta plaga son mucho más severos que los producidos por *Phthorimaea operculella*, ya que pueden llegar al 100% durante el almacenamiento, por lo que las pérdidas económicas son cuantiosas (PROINPA, 1999). Ambas especies (*P. operculella* y *S. tangolias*) pueden ser controladas también mediante el uso de la vegetación circundante (*Lantana camara*, *Eucalyptus globulus*, *Minthostachys sp* y *Cymbopogon citratus*) (RAMAN, 1988), insecticidas, virus de la granulosis PoGV (no patogénico contra *S. tangolias*) (REED Y SRINGETT, 1971; MATTHIESEN *et al.*, 1978; KROSCHER *et al.*, 1996; DAS *et al.*, 1998), la bacteria *Bacillus thuringiensis* (VON ARX Y GEPHARDT, 1990; SALAMA Y SALEM, 2000; SALAMA *et al.*, 1995 — referencia solo para *P. operculella*—; HERNÁNDEZ *et al.*, 2005); avispas de la familia Braconidae: *Apanteles subandinus*, *Bracon greeni*, *Orgilus lepidus* y los parasitoides de huevos *Copidosoma koehleri* de la familia Encirtidae (KROSCHER, 1995; RAMAN, 1994).

Muchas especies de hongos entomopatógenos son efectivos agentes microbianos de control biológico de diversas plagas de insectos (GOETTEL *et al.*, 2005), incluyendo algunas plagas de la papa (LACEY *et al.*, 1999; WRAIGHT Y RAMOS, 2005), sin embargo, las investigaciones sobre la factibilidad de usar hongos para el control de polilla de la papa es limitada (LACEY Y ARTHURS, 2006). Investigaciones de laboratorio sobre 2 especies de hyphomicetes comunes *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* indicaron que ellos tienen potencial para control de larvas, particularmente larvas jóvenes (HAFEZ *et al.*, 1997; SEWIFY *et al.*, 2000). HAFEZ *et al.* (1997) demostraron actividad de *B. bassiana* sobre pre-pupas, pupas y adultos de *P. operculella*. SEWIFY *et al.* (2000) reportaron que la combinación de *M. anisopliae* y PoGV

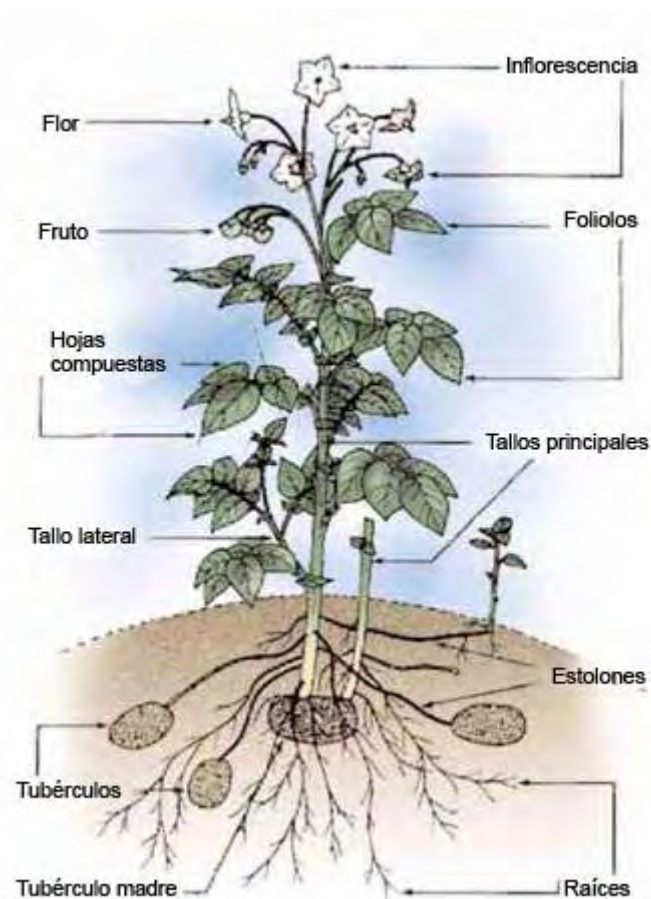
resultaron en un control larval sinérgico cuando utilizaron una combinación de alta concentración de hongos y baja concentración de virus.

Estudios propios no publicados sobre la actividad patogénica contra larvas de *P. operculella* y *S. tangolias* de dos cepas de *Beauveria brogniartii* denominados CIP-Huancayo y CIP-Cajamarca (recomendados y calificados como prospectivos en el control de polilla de la papa por VARGAS (2003), utilizando como método de aplicación del patógeno la inmersión de tubérculos de papa en suspensión conidial ( $10^8$  conidias por mL), en lugar de la aplicación por bañado de huevos de ambas especies con suspensión conidial empleado por VARGAS (2003), mostraron ausencia de diferencias significativas de mortalidad entre los tratamientos y control de *P. operculella* y *S. tangolias*; por lo que su aplicación en suspensión conidial sobre los tubérculos de papa contra ambas especies no resultó efectiva.

## **2.2. CONCEPTOS BÁSICOS**

### **LA PAPA (*Solanum tuberosum* Linneo)**

Es una planta dicotiledónea herbácea anual, potencialmente perenne debido a su capacidad de producción de tubérculos. Sus flores son pentámeras de colores diversos tienen estilo y estigma simple y óvulo bilocular. Los frutos maduros son redondos a ovales, de 1-3 cm de diámetro de color verde a amarillento o castaño o rojizo o violeta. Tienen 2 lóculos y 200-300 semillas. Los tallos son angulares, generalmente verde aunque puede ser púrpura. Herbáceos aunque en etapa avanzada de desarrollo la parte inferior puede ser relativamente leñosa. Las hojas adultas son pinnadas compuestas aunque las hojas primarias de la plantas así como las primeras hojas provenientes del tubérculo pueden ser simples.



**Figura 1.** La papa (Adaptado de CIP, 1983).

Las Raíces y Estolones se desarrollan de tallos subterráneos, entre el tubérculo semilla y la superficie del suelo y por lo tanto son la unidad de propagación vegetativa. El tubérculo se forma en el extremo del estolón o rizoma como consecuencia de la proliferación del tejido de reserva que resulta de un rápido desarrollo y división celular (AGROICA 2005).

La papa, es el cuarto cultivo sembrado en más de 100 países y es alimento básico en los países desarrollados (en Europa y USA consumen 75 kg por persona anualmente. A nivel mundial, se producen 290 millones de TM y se cultivan 13,85 millones de Ha. La papa contiene proteínas de alta calidad (2%) cuenta con todos los aminoácidos esenciales y vitamina C.

## LAS POLILLAS DE LA PAPA

### *Phthorimaea operculella* (Zeller)

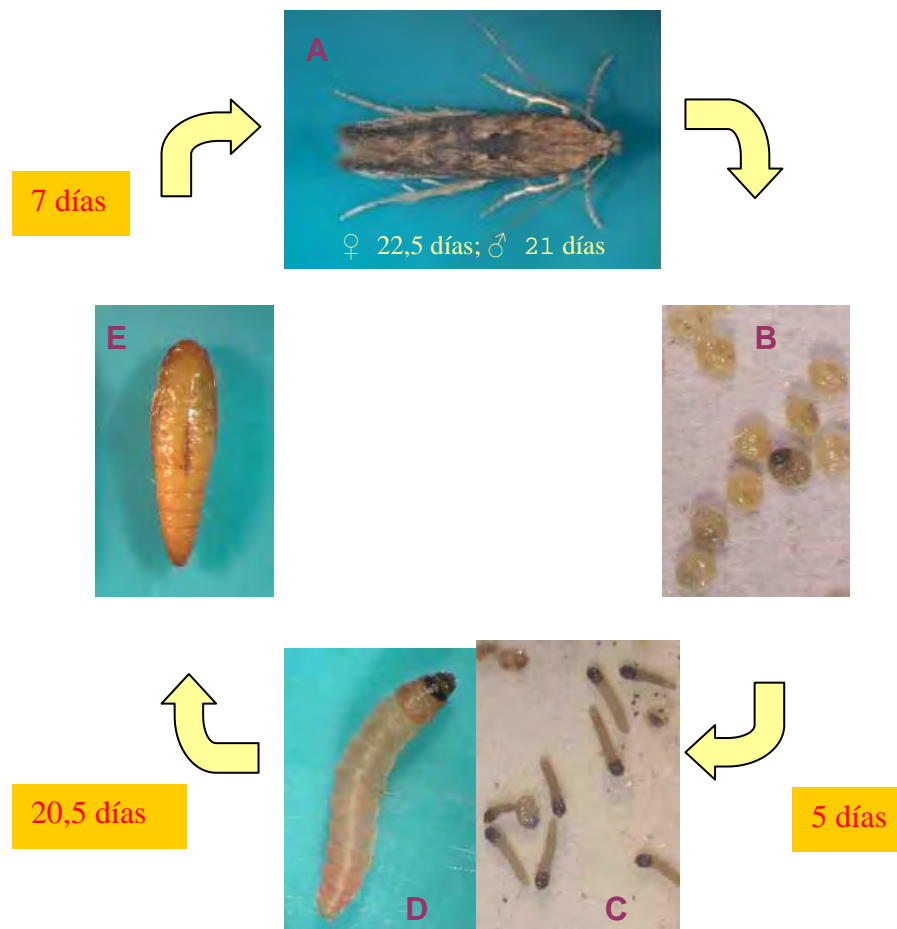
Es una polilla de 6 a 7 mm de largo y alas grisáceas. Considerada como una de las plagas de mayor importancia en cultivos de papa (AGRICULTURA, 2003). Tiene distribución mundial (cosmopolita) encontrándosele generalmente en áreas cálidas (tropicales y subtropicales) hasta alturas de 3000 msnm. Esta especie es originaria de Sudamérica (GRAF, 2000) y se ha diseminado en muchas áreas del mundo donde se cultiva papa es considerado como la plaga mas importante económicamente de papa en el tercer mundo (RADCLIFFE, 1982). Se le puede hallar desde el sur de Europa hasta Australia y Nueva Zelanda y desde Estados Unidos de Norte América hasta Japón. Esta plaga también ataca al tomate, tabaco, berenjena y otras solanáceas (CIP, 1992; KROSCHER Y SPORLEDER, 2006). Muchas fuentes confirman la presencia del granulovirus (*PoGV*) en poblaciones de PTM en áreas andinas de cultivo de papa de América del Sur (ALCÁZAR *et al.*, 1991, 1992); varios aislamientos y sus orígenes fueron resumidos por SPORLEDER (2003), África (BROODRYK y PRETORIUS, 1974; LAARIF *et al.*, 2003), Medio Oriente



**Figura 2.** Distribución mundial de *P. operculella* (Adaptado de KROSCHER Y SPORLEDER, 2006).

(KROSCHEL Y KOCH, 1994), Asia (ZEDDAM *et al.*, 1999; SETIAWATI *et al.*, 1999) Australia (REED, 1969; BRIESE, 1981) y América del Norte (HUNTER, *et al.*, 1975). A excepción del reporte de polilla de la papa infectado por *PoGV* en California por HUNTER *et al.* (1975) ninguna investigación importante se ha publicado sobre este virus en los Estados Unidos (LACEY y ARTHURS, 2006).

Presenta 5 fases de desarrollo (huevo, larva, pre-pupa, pupa y adulto). Según CHURA (1992), en condiciones de laboratorio (24,7°C) su ciclo biológico se cumple en aproximadamente 55 días. La hembra adulta coloca los huevos en los brotes de las plantas y hojas o la zona de tuberización, en grietas del suelo cerca a la base del tallo, y en los almacenes directamente sobre tubérculos o superficies con depresiones (AGRICULTURA,



**Figura 3.** Ciclo biológico de la polilla de la papa *Phthorimaea operculella*; A) adulto, B) huevo, C) y D) larva, E) pupa. (Condiciones de laboratorio y temperatura promedio de 24,75°C).

2003). Las larvas al nacer se alimentan del mesófilo foliar o tejidos corticales de los tubérculos produciendo perforaciones y cavando galerías. Al final del estadio la larva abandona el tubérculo, y recorre el lugar hasta encontrar partículas de arena o tierra para formar la cámara pupal (AGRICULTURA 2003).

### **Clasificación taxonómica**

Según ESSIG (1942) y citados por OJEDA y CASTRO (1972); VARGAS (2003), la polilla de la papa *P. operculella* tienen la siguiente clasificación:

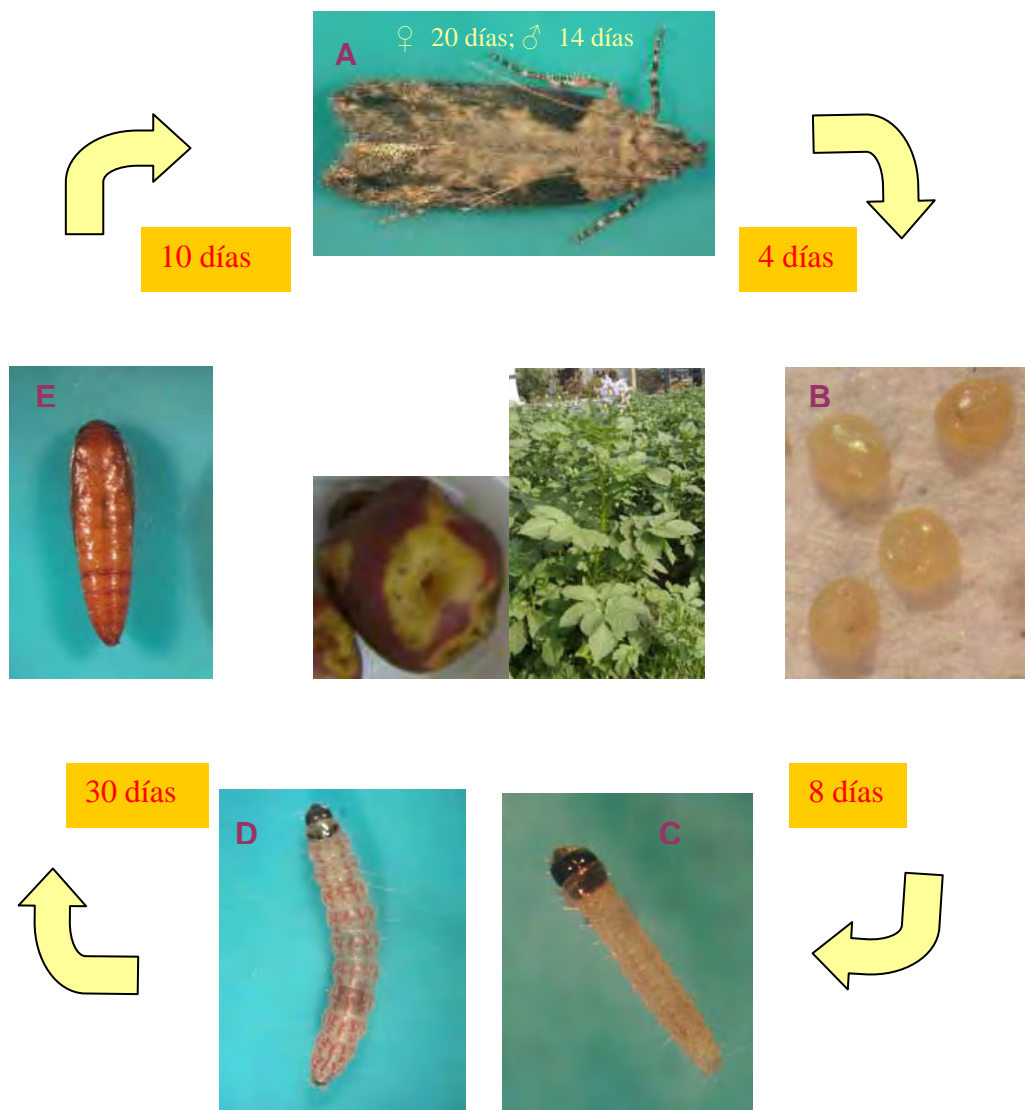
Reyno	: ANIMALIA
Phylum	: ARTHROPODA
Clase	: HEXAPODA
Orden	: LEPIDOPTERA
Sub orden	: FRENATAE
División	: HETERONEURA
Superfamilia	: GELECHIOIDEA
Familia	: GELECHIIDAE
Tribu	: GNORISMOSCHEMINI
Género	: <i>Phthorimaea</i> (Meyrick, 1902)
Especie	: <i>Phthorimaea operculella</i> (Zeller, 1873)

### ***Symmetrischema tangolias* (Gyen)**

Es una polilla de 6 a 7 mm de largo y alas grisáceas. Considerada como plaga de importancia en el cultivo de la papa, encontrándose generalmente en áreas con alturas hasta 3000 msnm. Esta especie durante los últimos años ha adquirido mayor importancia debido a su rápida dispersión (PROINPA, 1999). Es una plaga de la papa propia del área andina, encontrándose en las zonas altas de Perú Bolivia y Colombia. En el Perú se encuentra muy difundida en el Valle del Mantaro (ALCÁZAR *et al.* 1982), llegando a producir daños en el 87% de tubérculos en almacén (RAMAN, 1980) desde el sur hacia la

parte central del continente sudamericano, debido a flujo inadecuado de semillas. Los daños producidos por esta especie llegan a ser mucho más severos que los producidos por *P. operculella*. (PROINPA, 1999).

Según un estudio realizado por el PROINPA (1999) en condiciones de laboratorio con temperatura promedio de 20,3°C durante su ciclo biológico presenta 5 estadios: Huevo, larva, pre-pupa, pupa y adulto. Una hembra puede depositar alrededor de 108 huevos durante su vida (PROINPA 1999). En los almacenes, los huevos son depositados con prefe-



**Figura 4.** Ciclo de vida de la polilla andina de la papa, *Symmetrischema tangolias*; A) adulto; B) huevo; C y D) larvas de primer y ultimo estadio; E) pupa. (Los tiempos de cada estadio son para una temperatura promedio de 20,3 °C y 2750 msnm, PROINPA, 1999); ♀) hembras adultas y ♂) machos adultos.

rencia cerca o sobre los ojos o yemas de los tubérculos y pueden ser colocados en forma aislada o en grupos. Las larvas recién eclosionadas se desplazan lentamente, en el campo ingresan al tallo, barrenan y se alimentan de la médula perjudicando el flujo de la savia en la planta, luego penetran al tubérculo mediante orificios pequeños que realizan especialmente cerca de las yemas.

### **Clasificación taxonómica**

Según ESSIG (1942) y citado por VARGAS (2003), la polilla de la papa *Symmetrischema tangolias* tienen la siguiente clasificación

Reyno	: ANIMALIA
Phylum	: ARTHROPODA
Clase	: HEXAPODA
Orden	: LEPIDOPTERA
Sub orden	: FRENATAE
División	: HETERONEURA
Superfamilia	: GELECHIOIDEA
Familia	: GELECHIIDAE
Tribu	: GNORISMOSCHEMINI
Género	: <i>Symmetrischema</i> (Povolny, 1967)
Especie	: <i>Symmetrischema tangolias</i> (Gyen, 1913)

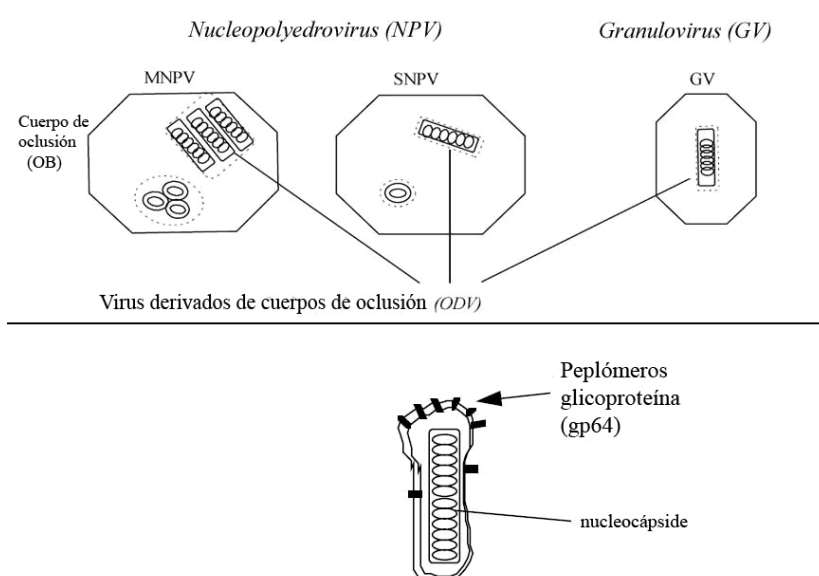
### **Baculovirus PoGV**

Los baculovirus son virus patogénicos de artrópodos y particularmente asociados a insectos. Los baculovirus comprenden el mayor grupo de virus de insectos, poseen gran potencial debido a su alta especificidad y ocurrencia natural para ser empleados como agentes de control biológico de insectos plaga en la agricultura y áreas forestales (MARTIGNONI, 1984; PAYNE, 1986; MOSCARDI Y SOSA-GÓMEZ, 1992; 1993; MOSCARDI, 1998). Son los más estudiados y de los cuales mayor información se tiene. Los baculovirus exclusivamente



fueron aislados de artrópodos, inicialmente de 4 órdenes de insectos: Lepidoptera, Hymenoptera, Díptera y Coleóptera (OECD, 2002). Además de Orthóptera, Neuróptera, Trichóptera, y también algunas clases de crustáceos y arácnidos (BILIMORIA, 1986, 1991; MARTIGNONI Y IWAI, 1986; ADAMS Y MCCLINTOCK, 1991; O'REILLY *et al.*, 1992). Los baculovirus se dividen en dos grupos: los nucleopolihedrovirus (NPV) y granulovirus (GV). Los GV son patógenos específicamente de insectos del orden Lepidoptera (TWEETEN *et al.*, 1981), generalmente atacan solo a una o dos especies; mientras los NPV tienen un mayor rango de hospederos entre los ordenes Hymenoptera, Díptera y Coleóptera (OECD, 2002). Alrededor de 633 especies fueron compilados, de los cuales aproximadamente 500 pertenecen al grupo de los NPV y mas de 130 al grupo de los GV (OECD, 2002). Se encuentran principalmente en el orden Lepidoptera (BLISSARD Y ROHRMANN, 1990).

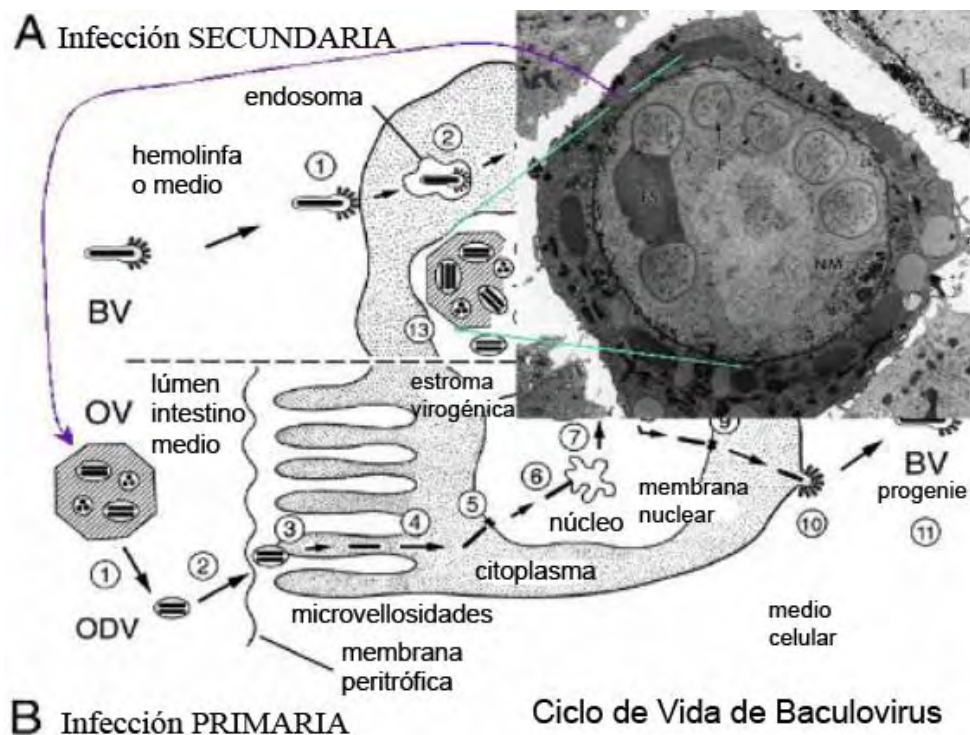
El genoma de los baculovirus está compuesto por un DNA circular de doble cadena, variando de 80-200 kb (ARIF, 1986); y esta envuelto por una cápside proteica. Los granulovirus se caracterizan por la forma ovocilíndrica triangular (TWEETEN *et al.*, 1981) del cuerpo de oclusión, denominado gránulo, con cerca de 300 a 500 nm de largo por 120 a



**Figura 5.** Morfología de baculovirus (FUENTE: Adaptado de OECD, 2002).

350 nm de ancho (CROOK, 1991; BERGOLD, 1963; HUGER, 1963) y generalmente poseen uno, o raramente dos a tres viriones por gránulo. La granulina es el principal componente proteico del granulovirus, y la polihedrina en los nucleopoliedrovirus (NPV).

El ciclo se inicia con la ingestión de granulovirus presentes en la superficie de las hojas u otras partes de la planta hospedera de insectos (principalmente se transportan por medio de lluvias y movimiento de artrópodos). Al llegar al intestino medio del insecto, el virus es sometido a pH alcalino que disuelve la granulina, liberando los viriones en el lumen digestivo. Las partículas infectivas penetran en las células epiteliales del intestino medio vía fusión de membrana, mediada por receptores específicos (HORTON Y BURAND, 1993). Las nucleocápsides son transportadas al núcleo, donde son desnudadas, liberando el DNA. La replicación de los virus en ambas células resulta en la producción de BV, responsable para la infección de otros tejidos. Para atravesar la lámina basal, matriz fibrosa extracelular que envuelve los tejidos del insecto, el virus utiliza el sistema traqueal, que tienen contacto di-



**Figura 6.** Ciclo vital y modo de acción de baculovirus. (Adaptado de OECD, 2002)

recto con las células epiteliales y otros tejidos del insecto, permitiendo a los virus invadir otros tejidos y provocar infección sistémica (ENGELHARD *et al.*, 1994). Los baculovirus han sido empleados en control de plagas y, por ser específicos y restringidos a invertebrados, son considerados agentes seguros de control biológico.

### ***Bacillus thuringiensis***

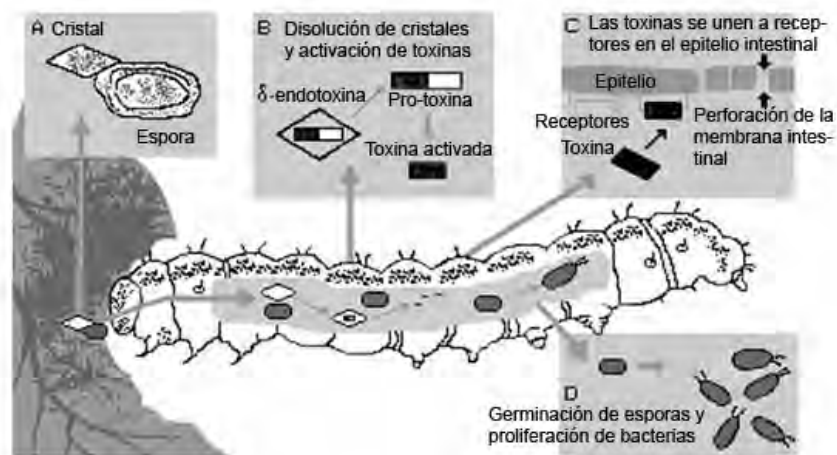
La bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner (conocido comúnmente como *Bt*) es un bioinsecticida comercializado a nivel mundial para el control de plagas en cultivos importantes; principalmente larvas de lepidópteros (DEACOM, 2005; CRANSHAW, 1999), gracias a su capacidad de formar un cuerpo paraesporal (delta endotoxina) con actividad tóxica (SHIEH, 1988; IPCS, 1999). A este microorganismo se le considera cosmopolita, pues sus esporas se han aislado de suelo (MEADOWS *et al.*, 1992; HOFFMAN, 1993), de larvas de insectos enfermos (KAELIN *et al.*, 1994; IPCS, 1999) o muertos especialmente de los géneros Coleoptera, Díptera y Lepidoptera (IPCS, 1999); de productos almacenados (KARAMANLIDOU *et al.*, 1991), y superficie de hojas de árboles y plantas (MEADOWS *et al.*, 1992; IPCS, 1999; HOFFMAN, 1993), aunque se considera mas frecuente aislarlo a partir de productos almacenados, pues las condiciones ambientales del almacén permiten la persistencia de sus esporas (MARTINEZ Y SÁNCHEZ, 1998) incluyendo la rizósfera de plantas (MEDRANO *et al.*, 1998). Usualmente, las carcasas de insectos muertos contienen grandes cantidades de esporas e ICPs que pueden retornar al medio ambiente (IPCS, 1999).

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) pertenece a la familia Bacillaceae, es una bacteria anaeróbica facultativa (IPCS, 1999) presenta células vegetativas en forma de bastoncillos más o menos largos, agrupados en cadenas de 2 a 3 células (FERNANDEZ Y VEGA, 2002). Son grampositivas y esporógenas, durante su cultivo y asociadas a la formación de esporas;

tienen la capacidad de formar cuerpos paraesporales proteicos (FERNANDEZ Y VEGA, 2002; IPCS, 1999) en forma de cristales.

Las ICP o el complejo espora-ICP deben ser ingeridas por el insecto susceptible (FERNANDEZ Y VEGA, 2002; IPCS, 1999), cuyo intestino tiene un pH elevado, el cual es esencial para la disolución (FERNANDEZ, Y VEGA 2002; IPCS, 1999) de muchas protoxinas de *B. thuringiensis*. Estas son solubles solamente con pH superiores a 9,5. Las protoxinas de 130 kDa son cortadas por proteasas del intestino, y dan lugar a una toxina biológicamente activa (IPCS, 1999) de 55-65 kDa, resistente a proteasas, esta propiedad conferida por la región N terminal de la protoxina (FERNANDEZ Y VEGA, 2002).

La especificidad de la delta endotoxina a un tipo de insecto en particular implica la presencia de receptores de membrana específicos, mediante el dominio C-terminal de la toxina activa (IPCS, 1999), la toxina se inserta de forma irreversible a la membrana plasmática de las células intestinales y el próximo paso es la formación de un poro o lesión en la membrana que conduce a una variación en su permeabilidad, alterando el transporte de iones potasio, lo cual trae como consecuencia lisis celular, disrupción de la integridad del intestino (FERNANDEZ Y VEGA, 2002) por el dominio N-terminal (IPCS, 1999). En este mo-



**Figura 7.** Mecanismo de acción de *Bacillus thuringiensis* (Adaptado de IPCS, 1999).

mento las larvas afectadas se hacen inactivas, detiene su alimentación y pueden regurgitar o evacuar excrementos líquidos (HOFFMAN, 1993); deviniendo la muerte del insecto. Por otra parte la germinación de esporas y la proliferación de las células vegetativas dentro del hemocele pueden conducir a una septicemia, contribuyendo a causar la muerte (IPCS, 1999).

## **2.3. TEORÍAS BÁSICAS**

### **CONTROL MICROBIANO DE INSECTOS PLAGA EN CULTIVOS AGRÍCOLAS**

El Control Biológico es la represión de las plagas mediante sus enemigos naturales; es decir mediante la acción de predadores, parásitos y patógenos. Los parásitos de las plagas, llamados también parasitoides, son insectos que viven a expensas de otro insecto (hospedero) al que devoran progresivamente hasta causarle la muerte. Durante ese tiempo completan su propio desarrollo larval. Los predadores son insectos u otros animales que causan la muerte de las plagas (víctimas o presas) en forma más o menos rápida succionándoles la sangre o devorándolos. Los patógenos son microorganismos: virus, rikettsias, bacterias, protozoarios, hongos y nemátodos, que causan enfermedades o epizootias entre las plagas (CISNEROS, 1980).

Un microorganismo para ser utilizado en control de plagas de cultivos agrícolas debe reunir entre sus requisitos: Alta patogenicidad, alta eficiencia de transmisión, habilidad de persistencia en el medio ambiente, facilidad de reproducción y almacenamiento (FUENMAYOR Y SAYAGO, 2007). Según (HOFFMANN Y FRODSHAM, 1993) las mejores características de los patógenos de insectos son: Su capacidad de eliminar, reducir la reproducción, disminuir el crecimiento o interrumpir el ciclo de vida. Usualmente son específicos sobre los insectos plaga o estadio de vida. Su efectividad depende de las condiciones ambientales o abundancia del hospedero. El grado de control por la presencia

natural del patógeno puede ser imprevisible. Ellos son de acción relativamente lenta, pudiéndoles tomar varios días o mucho mas tiempo para proveer un control adecuado. Pueden causar epizootias. Teniendo estas consideraciones para efectos de control biológico de polilla de la papa son de interés prospectivo *PoGV* específicamente contra *P. operculella* (ANGELES Y ALCÁZAR, 1995) y *Bt* contra *P. operculella* y *S. tangolias* además de hongos del género *Beauveria* (VARGAS, 2003).

## **INTERACCIÓN ENTRE ENTOMOPATOGENOS**

Una interacción entre patógenos, según HUNTER-FUJITA (1998), puede definirse como el efecto, usualmente medido en terminos de mortalidad del hospedero, de un entomopatógeno en presencia de otro factor, como un segundo entomopatógeno o insecticida químico. Los estudios sobre interacciones entre patógenos tienden a tener dos direcciones principales. En primer lugar, la mayoría de las investigaciones en las cuales la mortalidad total es mucho mayor que la esperada, a partir de la suma de mortalidades de cada uno de los dos patógenos actuando por separado, es decir, sinergismo verdadero. En segundo lugar, pueden buscar medios de reducir, quizás por razones ambientales, la dosificación de un insecticida químico identificando un entomopatógeno compatible para uso simultáneo. En este caso, el efecto es la suma de las dos mortalidades actuando independientemente (efecto aditivo) puede ser aceptable, mientras que el sinergismo es un efecto extra. Las interacciones en la cual la mortalidad total es menor que la suma de mortalidades esperadas a partir cada componente actuando de manera individual, son por supuesto, inaceptables y son definidos como antagonismo.

Los efectos de los baculovirus y otros patógenos pueden ser sinérgicos, aditivos y en algunos casos antagónicos (ESPINOZA, 1994). Los resultados han variado considerablemente en los ensayos realizados empleando baculovirus más bacterias, resultando en varios casos

efectos sinérgicos y en otros antagónicos (HARPER, 1986). ZHANG XUNHAO *et al.* (1996) probaron la eficiencia de una mezcla entre *Bt* y NPV de *Helicoverpa armigera*, obteniendo una eficacia de control de 95%, sin causar daño a los enemigos naturales ni al medio ambiente. Investigaciones realizadas evaluando la interacción entre parasitoides y baculovirus han concluido que los parasitoides murieron dentro del insecto hospedero, si el hospedero ha muerto debido a la acción del virus antes de que se haya completado el desarrollo del parasitoide (HARPER, 1986).

## **FORMULACIÓN DE ENTOMOPATÓGENOS**

La elaboración de fórmulas es el proceso mediante el cual se mezclan componentes activos, como granulovirus *PoGV* purificados o principios activos de *B. thuringiensis* con materiales inertes, tales como solventes, vehículos y otros aditivos. Estos materiales inertes por sus características deben contribuir de manera que: los componentes activos tengan una distribución homogénea; mejoren la efectividad del pesticida en el campo; mejoren las características de seguridad; y ayude con las calidades de manejo (WHITFORD, 2006).

Existen dos tipos de fórmulas: a) seca o polvo mojable, en la cual se utiliza un vehículo que puede ser de origen mineral o vegetal que ayuda mantener los niveles de humedad y viabilidad por un tiempo considerable y b) líquida o en emulsión, donde el líquido utilizado tiene la función de mantener suspendidos los entomopatógenos en el medio para lograr una mezcla homogénea que garantice una buena aplicación. Además este líquido debe evitar la absorción de agua por las entomopatógenos y mantener su viabilidad (MONZÓN, 2001). Ambas fórmulas deben ser de fácil manejo y su uso depende de la disponibilidad. Según WHITFORD Y FRED (2006) una decisión bien considerada sobre la fórmula más apropiada para una cierta aplicación debe incluir el análisis de los siguientes factores: La seguridad del

aplicador, la preocupación por el medio ambiente, la biología de la plaga, el equipo disponible, las superficies que deben ser protegidas y el costo.

## 2.4. HIPÓTESIS

### **Hipótesis General:**

Las aplicaciones con fórmulas en polvo combinadas de *PoGV* y *Btk* o individuales de *Btk* sobre tubérculos de papa son eficaces para controlar poblaciones de *Phthorimaea operculella* y *Symmetrischema tangolias*.

### **Hipótesis específicas:**

- Las Aplicaciones individuales de *PoGV* y *Btk* en suspensión acuosa sobre tubérculos de papa son eficaces para controlar larvas de *P. operculella*.
- Las aplicaciones individuales de *Btk* en suspensión acuosa sobre tubérculos de papa son eficaces para controlar larvas de *Symmetrischema tangolias*.
- Aplicaciones combinadas de *PoGV* y *Btk* mejoran la actividad de control de poblaciones de *P. operculella*.
- Los materiales inertes talco, caolín, cal y arena aplicados sobre tubérculos de papa ejercen actividad de protección contra larvas de *P. operculella* y *S. tangolias*.
- Las fórmulas individuales de *PoGV* y *Btk* en polvo aplicados sobre tubérculos de papa mejoran la eficacia de control de poblaciones de larvas de *P. operculella* y *S. tangolias*, cuando son comparados a aplicaciones de los mismos patógenos en suspensión acuosa.
- Aplicaciones de fórmulas combinadas de *PoGV* y *Btk* e individuales de *Btk* son eficientes para el control de poblaciones mixtas de *P. operculella* y *S. tangolias* en almacenes de productores de papa.



### **III PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN**

La investigación se enmarca dentro de los tipos: experimental, aplicada y de campo; mediante manipulación de variables experimentales como niveles de concentración de patógenos (*PoGV* y *Btk* o combinación de los mismos) en suspensión acuosa o fórmula en polvo, dosis de aplicación de materiales inertes (talco, caolín, cal, arena), en condiciones controladas a nivel de laboratorio o condiciones naturales en almacenes de productores de papa, con la finalidad de describir de que modo se producen las respuestas de mortalidad en las poblaciones de larvas de polilla de la papa en estudio. Por el nivel de conocimientos adquiridos, la presente investigación es de tipo exploratoria, descriptiva y explicativa.

#### **3.2. MÉTODO Y DISEÑO**

La determinación de actividad de los patógenos *PoGV* y *Btk* fue a través de bioensayos. El diseño de los mismos consistió en evaluar diferentes tratamientos (5 a 6 concentraciones, de patógenos en suspensión acuosa o fórmula en polvo, detalladas en las secciones correspondientes a la metodología de cada bioensayo) de ambos patógenos, aplicados a tubérculos de papa. Cada tratamiento a su vez tuvo entre 4 a 6 repeticiones. Por cada repetición se inocularon 50 larvas neonatas de polilla de la papa. Los bioensayos contaron además con un tratamiento control sin aplicación de patógeno o material inerte alguno. Los bioensayos para evaluación de interacción de patógenos tuvieron tratamiento similar con la incorporación de tratamientos combinados de ambos patógenos según las proporciones detalladas más adelante. En los bioensayos de evaluación de fórmulas de patógenos en polvo fue necesario incorporar otro tratamiento control, solo esta vez con material inerte. El diseño de bioensayo en los almacenes de productores de papa consistió en tres tratamientos, 2 con aplicación de fórmulas de patógenos en polvo sobre los tubérculos de papa y un tratamiento control sin aplicación

alguna de fórmulas. Los diseños para cada bioensayo están ampliamente desarrollados más adelante en las secciones que corresponden a cada uno de los mismos.

### **3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA**

A nivel de los bioensayos de laboratorio para la determinación de la actividad de patógenos en fórmula y de los materiales inertes, las poblaciones de estudio fueron larvas neonatales de *Phthorimaea operculella* y *Symmetrischema tangolias* obtenidas a partir de la eclosión de posturas proporcionadas por las unidades de crianza de la División de Protección de Cultivos del CIP. En la evaluación de interacción entre *PoGV* y *Btk* la población de estudio fue solamente larvas neonatales de *P. operculella*. En los estudios de evaluación de fórmulas de patógenos en almacenes, las poblaciones de estudio fueron las larvas de polilla de la papa presentes en los almacenes de productores de papa en la provincia de Huancayo.

Las poblaciones de muestra en los estudios de laboratorio para las determinaciones de actividad de patógenos en fórmula y materiales inertes, fueron entre 1200 a 2100 larvas neonatas de ambas especies de polilla de la papa, según el diseño de cada bioensayo. Los bioensayos de evaluación de interacción entre *PoGV* y *Btk* se hicieron con una población muestra de 20800 larvas neonatales de *P. operculella*; empleados según el diseño descrito mas adelante. La población de muestra para los estudios en almacenes de productores, lo constituyeron las larvas de ambas especies de polilla presentes en condiciones naturales en 15 almacenes ubicados en los distritos de Chongos, Huachac, Ahuac, Marcatuna y Vixo de la provincia de Huancayo.

### **3.4. VARIABLES DE ESTUDIO**

#### **Variables dependientes:**

- Mortalidad en larvas de ambas especies de polilla de la papa en los diferentes bioensayos de laboratorio.

- Niveles de infestación, por larvas y pupas de ambas especies de polilla, de tubérculos de papa almacenados.

#### **Variables independientes:**

- Patógenos (*PoGV* y *Btk*).
- Concentración de patógenos (aplicados en suspensión acuosa o fórmula en polvo).
- Materiales inertes (talco, caolín, cal y polvo de arena).
- Dosis de aplicación de materiales inertes.
- Especies de polilla de la papa (*P. operculella* y *S. tangolias*).
- Fórmulas aplicadas en almacén.
- Zonas de ubicación de los almacenes
- Tiempo de almacenamiento de tubérculos.

### **3.5. LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DE LOS LUGARES DE ESTUDIO**

El presente trabajo se realizó en una primera etapa en los laboratorios de Entomología de la División de Protección de Cultivos del Centro Internacional de la Papa (CIP), ubicado en el distrito de La Molina, Lima - Perú (12°05' latitud sur y 76°57' longitud oeste), a una altitud de 240 msnm. La etapa de campo se desarrolló en 15 almacenes de agricultores productores de papa ubicados en los distritos de Chongos, Huachac, Ahuac, Marcatuna y Vixto de la provincia de Huancayo (12°07' latitud sur y 75°21' longitud oeste) en la Región Junín (ubicada en los andes centrales del Perú, entre los 10°40'55" y 12°43'10" latitud sur y 73°26'30" y 76°30'40" de longitud oeste), a una altitud de 3300 msnm.

### 3.6. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS

#### 3.6.1. Material Biológico

Huevos y larvas neonatas de *Phthorimaea operculella* (Zeller) y *Symmetrischema tangolias* (Gyen) obtenidos de poblaciones de crianza, mantenidas en el Centro Internacional de la Papa (CIP) sobre tubérculos de papa (cv. Peruanita) en ambientes con temperaturas de 23-28°C para *P. operculella* y 20°C con *S. tangolias*; 60 - 80% de humedad relativa y fotoperiodo natural.

Se utilizó PoGV aislado originariamente de larvas enfermas de *P. operculella* encontrados en el distrito de La Molina, Lima-Perú en 1986 (ALCÁZAR *et al.*, 1991), propagado, purificado y concentrado por el Centro Internacional de la Papa (CIP).

En la propagación, los virus PoGV fueron aplicados en suspensión acuosa a huevos de *P. operculella*, utilizando el método de bañado superficial de huevos adheridos a discos de papel filtro (método de inmersión de huevos). Las larvas al eclosionar de estos huevos tratados con PoGV, se infestaron luego a tubérculos de papa (cv. Peruanita) y más tarde fueron recolectados como larvas enfermas en estadíos de desarrollo mas avanzado y procesadas finalmente para la extracción y purificación viral por ultra-centrifugación (50 000 g; 4°C; 1 hora) en azúcares de concentración descendente (sucrose al 80%; 65% y 45%). Los virus purificados fueron resuspendidos en Buffer Tris 0,1M y conservados a -20°C hasta su utilización.

Tambien se utilizó el insecticida biológico comercial de uso agrícola DiPel 2X (*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*), con principios activos entomopatógenicos que contenían endotoxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A (6,4% de ingredientes activos; 32000 UI por mg de DiPel 2X según la información consignada en la etiqueta del producto).

Otro material fueron tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) cultivar “Peruanita”, con un peso aproximado de 70 a 80 gramos por unidad; lavadas a presión en chorro de agua fría, secadas a temperatura ambiente y seleccionadas sin daños físicos, ni signos de infestación por plagas o infección por otros microorganismos.

### **3.6.2. Materiales Inertes**

Para la preparación de fórmulas de patógenos y medición de su actividad sobre larvas de ambas especies de polilla se utilizaron productos comerciales en polvo como talco, de uso convencional en fórmulas; y otros conocidos como caolín y cal, empleados tradicionalmente por los agricultores en sus zonas de producción para la protección de tubérculos almacenados contra diversas plagas. También se utilizó polvo de arena (partículas  $< 50 \mu\text{m}\varnothing$ ), obtenido por tamizado a partir de sedimentos de este material.

### **3.6.3. Obtención de población de larvas neonatales de *Phthorimaea operculella* (Zeller) Y *Symmetrischema tangolias* (Gyen)**

Se inicia con el aprovisionamiento de huevos de *P. operculella* y *S. tangolias*; adheridos a discos de papel filtro (posturas); producidos en los ambientes de crianza de la División de Protección de Cultivos del CIP-La Molina.

Los discos de postura fueron colocados en placas petri, sellados con parafilm e incubados a 24°C (*P. operculella*) y 20°C (*S. tangolias*), hasta la eclosión de los huevos (al cabo de 4 y 7 días para cada especie). Las larvas recién eclosionadas (larvas neonatales) quedaron listas para ser utilizadas en la infestación de los tubérculos de papa en los diferentes bioensayos. Se hizo tan pronto fue posible ( $< 4$  horas después de la eclosión).

#### 3.6.4. Proceso de bioensayos

Los bioensayos se llevaron a cabo en envases de plástico de 500 mL. Estos envases fueron acondicionados interiormente con papel toalla y contaron con tapas de cierre hermético provistas de una ventana de aireación cubierta con papel tissue. Esto para evitar la acumulación de humedad, impedir la fuga de larvas y mantener el flujo de aire entre el interior y exterior del envase.

Según la finalidad y requerimientos del bioensayo fue necesario estar provistos de larvas L<sub>1</sub> de *P. operculella* o *S. tangolias*, recientemente eclosionadas, además de tubérculos de papa con o sin tratamiento a razón de 2 tubérculos por cada envase.

El tratamiento de los tubérculos de papa con las fórmulas en suspensión acuosa de *PoGV* y *Btk* o la mezcla de ambos, fue por inmersión durante 1 minuto aproximadamente y manteniendo homogénea la suspensión. Los tubérculos tratados se secaron sobre papel toalla en bandejas de plástico a temperatura ambiente, sin exposición a la luz solar.

El tratamiento de los tubérculos con los materiales inertes (talco, caolín, cal o arena) y fórmulas de patógenos *PoGV* y *Btk* en polvo se hicieron por impregnación. Este se hizo en bolsas plásticas transparentes, donde se depositaron tubérculos de papa previamente pesados y sus correspondientes cantidades de material inerte o fórmulas de patógenos según las dosis de aplicación o en evaluación. Las bolsas con su contenido fueron cerradas y agitadas hasta la total impregnación y cobertura de los tubérculos (incluyendo sus yemas).

Para la inoculación con larvas neonatales, previamente se dispusieron 2 tubérculos de papa con o sin tratamiento en los envases de bioensayo. Los tubérculos así dispuestos fueron inoculadas con 50 larvas neonatales de *P. operculella* o *S. tangolias* según la especie en evaluación. Este proceso, por ser un punto crítico del bioensayo, se hizo teniendo el máximo cuidado de no lesionar la integridad de las larvas. La inoculación se hizo utilizando

pinceles de dibujo n° 0 y capturando las larvas, solo a través del hilo de seda que ellas mismas producen, del cual se suspenden cuando se invierte y golpea suavemente la placa petri que las contiene con ayuda del pincel. Las larvas así capturadas fueron depositadas sobre los tubérculos hasta completar la cantidad de 50 individuos.

Los envases debidamente tapados se llevaron a incubación en ambientes con temperatura controlada de 25°C para *P. operculella* y 20°C para *S. tangolias*. Durante la incubación se hicieron 2 evaluaciones a los 14 y 21 días (*P. operculella*) ó 21 y 28 días (*S. tangolias*), registrando y separando en cada evaluación las pupas, larvas enfermas y muertas encontradas. Los datos obtenidos se utilizaron para la determinación de las respuestas de actividad según la finalidad del bioensayo.

En los bioensayos donde *S. tangolias* fue la especie en evaluación ha sido necesario colocar trozos de cartón (3 × 3 cm) dentro de los envases a los 14 días desde la instalación, con la finalidad de proporcionar a las larvas sobrevivientes superficies de empupamiento.

### **3.6.5. Bioensayos de actividad biológica de *PoGV* y *Btk* en suspensión acuosa sobre *P. operculella* y *S. tangolias***

#### **Preparación de suspensión stock de *PoGV* y *Btk***

La suspensión stock de *PoGV* se preparó a partir de granulovirus purificado y concentrado siguiendo los protocolos desarrollados en la División de Protección de Cultivos del CIP. Los granulovirus concentrados fueron resuspendidos en agua destilada hasta una concentración de  $10^{10}$  gránulos por mL. La concentración de *PoGV* en la suspensión stock fue determinada según el método del hemocitómetro (cámara de Neubauer Sigma, profundidad de 0,1 mm y microscopio de contraste de fase Olympus BH-2) y verificada por espectrofotometría como fue descrito por SPORLEDER *et. al.* (2005). La suspensión stock de *PoGV* finalmente preparada tuvo una concentración de  $1,2 \times 10^{10}$  gránulos por mL.

La preparación de la suspensión stock de *Btk* se realizó mezclando las cantidades necesarias de DiPel 2X (medidas en balanza de precisión) en agua destilada, según la concentración requerida en los bioensayos. Las suspensiones stock de *Btk* fueron preparadas momentos antes de la instalación de cada bioensayo, en tanto que la de *PoGV* pudo ser almacenada en congelación (-20°C) y utilizada cada vez que se instaló un bioensayo.

### **Preparación de fórmulas en suspensión acuosa**

Se realizaron por dilución seriada de las suspensiones stock de *PoGV* o *Btk*, utilizando factores de dilución según las concentraciones (tratamientos) y volúmenes necesarios en los diferentes bioensayos. Las diluciones se hicieron en vasos de precipitado de 500 mL. Los volúmenes para las diluciones fueron medidos utilizando pipeta automática. Las mezclas de suspensiones acuosas se mantuvieron homogéneas para las diluciones utilizando agitador magnético.

### **Bioensayos de actividad de *PoGV* en suspensión sobre *P. operculella***

Se realizaron cinco bioensayos de los cuales tres (bioensayos 1; 2 y 5) tuvieron 7 tratamientos (6 tratamientos con aplicación de *PoGV* en suspensión y una prueba control sin aplicación alguna). Cada tratamiento con 6 repeticiones (4 repeticiones en el bioensayo 5) y 50 larvas neonatas por cada repetición. Las concentraciones de los tratamientos con *PoGV* fueron entre  $1,20 \times 10^9$  a  $2,03 \times 10^4$  gránulos por mL (factor de dilución: 9) y la prueba control sin aplicación de *PoGV*. Las concentraciones de *PoGV* en los bioensayos 3 y 4 fueron entre  $2,39 \times 10^8$  y  $5,83 \times 10^4$  gránulos por mL (factor de dilución: 8); la prueba control como en los anteriores casos sin aplicación de *PoGV*.

La aplicación de *PoGV*, inoculación, incubación y evaluación para este tipo de bioensayos se hizo siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.6.4.



### **Bioensayos de actividad de *Btk* en suspensión sobre *P. operculella***

Con la finalidad de medir la curva de relación entre mortalidad y concentración de *Btk* sobre *P. operculella*, Se infestaron con larvas neonatas de *P. operculella* tubérculos de papa tratados con *Btk*. Se llevaron a cabo 5 bioensayos en diferentes periodos de tiempo (bioensayos 1; 2; 3; 4 y 5). Los cuatro primeros bioensayos se instalaron con 6 tratamientos (5 tratamientos con *Btk* y una prueba control). En el primer y cuarto bioensayo las concentraciones utilizadas fueron  $3,5 \times 10^4$ ;  $1,0 \times 10^4$ ;  $2,86 \times 10^3$ ,  $8,16 \times 10^2$ , y  $2,33 \times 10^2$  mg DiPel 2X por litro) preparadas utilizando un factor de dilución 3,5. En el segundo bioensayo las concentraciones fueron  $9,32 \times 10^2$ ;  $1,98 \times 10^2$ ;  $4,22 \times 10^1$ ; 8,97 y 1,91 mg de DiPel 2X por litro, preparadas utilizando un factor de dilución 4,7. En el tercer bioensayo las concentraciones fueron  $4 \times 10^3$ ;  $8 \times 10^2$ ;  $1,6 \times 10^2$ ;  $3,2 \times 10^1$  y 6,40 mg por litro, preparadas utilizando un factor de dilución 5. El quinto bioensayo se hizo con 7 tratamientos; las concentraciones fueron  $3,5 \times 10^4$ ;  $5,00 \times 10^3$ ;  $7,14 \times 10^2$ ;  $1,02 \times 10^2$ ;  $1,46 \times 10^1$  y 2,08 mg DiPel 2X por litro, preparadas utilizando un factor de dilución 7. El número de repeticiones por cada tratamiento en los tres primeros bioensayos fue de 6 y en los dos últimos 4.

La aplicación de *Btk*, inoculación, incubación y evaluación para este tipo de bioensayos se hizo siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.6.4.

### **Bioensayos de actividad de *Btk* en suspensión sobre *S. tangolias***

Con la finalidad de medir la curva de la relación entre mortalidad y concentración de *Btk* sobre *S. tangolias*, Se infestaron con larvas neonatas tubérculos de papa tratados con suspensión acuosa de DiPel 2X. Fueron realizados 3 bioensayos en diferentes periodos de tiempo (bioensayos 1; 2; y 3). En el primero y segundo las concentraciones utilizadas fueron  $3,5 \times 10^4$ ;  $1,0 \times 10^4$ ;  $2,86 \times 10^3$ ,  $8,16 \times 10^2$ , y  $2,33 \times 10^2$  mg de DiPel 2X por litro, preparadas utilizando un factor de dilución de 3,5. En el tercer bioensayo las

concentraciones fueron  $3,5 \times 10^4$ ;  $5,00 \times 10^3$ ;  $7,14 \times 10^2$ ;  $1,02 \times 10^2$ ;  $1,46 \times 10^1$  y 2,08 mg de DiPel 2X por litro, preparadas utilizando un factor de dilución de 7.

La aplicación de DiPel 2X (*Btk*), inoculación, incubación y evaluación para este tipo de bioensayos se hizo siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.6.4.

### **3.6.6. Bioensayos con materiales inertes**

#### **Aplicación de material inerte**

La aplicación de los tubérculos de papa con los materiales inertes (talco, caolín, cal y arena) se hicieron por impregnación, instantes antes de la instalación de cada bioensayo. Este proceso se efectuó en bolsas plásticas donde fueron depositados los tubérculos (cada unidad con un peso aproximado de 50 g) según la cantidad necesaria acorde al número de repeticiones (2 tubérculos por repetición). La cantidad de talco aplicado en cada tratamiento fue en función al peso de los tubérculos y la dosis de material inerte en evaluación. Una vez colocados los tubérculos y el material inerte dentro de la bolsa de plástico esta fue cerrada y agitada vigorosamente hasta conseguir total impregnación y cobertura homogénea del material inerte sobre la superficie del tubérculo, incluyendo las yemas del mismo. Luego los tubérculos tratados fueron colocados por pares en envases de plástico acondicionados con papel toalla, listos para la infestación con larvas neonatas de *P. operculella* o *S. tangolias*.

#### **Bioensayos de actividad de talco, caolín, cal y polvo de arena sobre *P. operculella* y *S. tangolias***

Con la finalidad de determinar el efecto de la dosis de talco, caolín, cal y polvo de arena aplicados a tubérculos de papa, sobre la mortalidad de *P. operculella* y *S. tangolias*. Se evaluaron 6 dosis (0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 y 15 g de talco por kg de papa) de aplicación, con 6 repeticiones por cada dosis y para ambas especies (4 repeticiones en los bioensayos con

caolín y polvo de arena para *S. tangolias*). El número de repeticiones para las pruebas control (sin aplicación de material inerte) fue el mismo que para las dosis en evaluación. La aplicación de material inerte, inoculación, incubación y evaluación para este tipo de bioensayos se hizo siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.6.4. La mortalidad fue evaluada en función de la cantidad de larvas que no lograron empupar durante el periodo de incubación.

Un bioensayo de medición de la actividad del talco fue repetido para *P. operculella*; las dosis aplicadas fueron 1,5; 2,2; 3,3; 5; 7,5 y 11,3 g de talco por kg de papa. El bioensayo tuvo 6 repeticiones por dosis y una prueba control con el mismo número de repeticiones.

**Bioensayo de comparación de la actividad de materiales inertes a dosis de 5 g por kg sobre *P. operculella* y *S. tangolias* inoculadas en estadio de huevo y larva**

Con la finalidad de comparar el efecto del talco, caolín, cal y polvo de arena aplicados a tubérculos de papa en una misma dosis, sobre la mortalidad de larvas de *P. operculella* y *S. tangolias* expuestas e inoculadas en estadio de huevo y larva neonata, se trataron tubérculos de papa con los materiales mencionados a una dosis de 5 g por kg de papa. El tratamiento de tubérculos, infestación, incubación y evaluación de bioensayos se hizo siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.6.4. Para el caso específico de inoculación a partir de la exposición de huevos de ambas especies de polilla a los tubérculos aplicados con material inerte, se cortaron discos de oviposición en trozos de tal forma que cada uno tuviera cantidades cercanas a 80 huevos adheridos, registrándose la cantidad de los mismos. Estos trozos de disco fueron atravesados con un alfiler y colocados en los envases de bioensayo sobre los tubérculos tratados y sometidos a incubación. Al cabo de 5 días, los trozos de disco que contenían los huevos, fueron retirados y sometidos a un nuevo conteo; esta vez de la cantidad de huevos que no habían logrado eclosionar, estableciendo a partir de la

diferencia respecto al número de huevos inicial, la cantidad de larvas en evaluación. El resto de etapas del bioensayo fue el mismo que se siguió para el caso de inoculación por larvas.

Se evaluaron 4 repeticiones por cada material inerte y forma de inoculación en ambas especies (16 tratamientos). El bioensayo incluyó además 2 pruebas control por cada especie (una prueba control con inoculación por larvas y otra con exposición de huevos), sin aplicación de material inerte sobre los tubérculos.

### **3.6.7. Bioensayos con fórmulas de *PoGV* y *Btk* en material inerte**

#### **Preparación de fórmulas de *PoGV* y *Btk* en material inerte**

Se realizó a partir de la mezcla de diluciones sucesivas de suspensiones stock de *PoGV* o DiPel 2X (*Btk*) en agua destilada, según los factores de dilución y concentraciones necesarias en los bioensayos, con materiales inertes (talco o arena en polvo). La mezcla de cada dilución con los materiales inertes se realizó en placas petri a razón de 1 mililitro por gramo de material. Las mezclas fueron homogenizadas con ayuda de una espátula y secadas a temperatura ambiente (sin exposición a la luz solar) hasta la completa evaporación del agua en la fórmula (1 día después de preparada la fórmula).

La fórmula fue pulverizada finalmente con ayuda de un mortero y conservada en refrigeración, hasta su utilización en los bioensayos.

#### **Bioensayos de actividad de *PoGV* formulado en talco contra *P. operculella***

Con la finalidad de medir la curva de relación entre mortalidad de *P. operculella* y la concentración de *PoGV* formulado en talco. Se infestaron con larvas neonatas de esta especie tubérculos de papa tratados con fórmulas de *PoGV* en talco. Se realizó 1 bioensayo con 8 tratamientos (6 tratamientos con fórmulas de *PoGV*, una prueba control de material inerte y otra sin material inerte). El número de repeticiones por cada tratamiento fue de 6

(50 individuos por repetición). La mayor concentración utilizada fue  $1,2 \times 10^9$  granulovirus por gramo de fórmula, las subsiguientes 5 fórmulas tuvieron un factor diferencial de concentración de 9. Las concentraciones fueron por lo tanto las siguientes:  $1,2 \times 10^9$ ;  $1,33 \times 10^8$ ;  $1,48 \times 10^7$ ;  $1,65 \times 10^6$ ;  $1,83 \times 10^5$  y  $2,03 \times 10^4$  gránulos por gramo de talco. La aplicación de fórmulas, inoculación, incubación y evaluación de bioensayos se hizo siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.6.4.

Durante la evaluación se hizo además del conteo de pupas una recolección de larvas enfermas o muertas con el signo típico que produce el *PoGV* (larvas blancas y de movimiento lento).

#### **Bioensayos de actividad de *PoGV* formulado en arena contra *P. operculella***

Con la finalidad de medir la curva de relación entre mortalidad y concentración de *PoGV* sobre *P. operculella*, se infestaron con larvas neonatas tubérculos de papa (cv “Peruanita”) tratados con fórmula de *PoGV* en polvo de arena. Se realizó 1 bioensayo con 7 tratamientos (6 tratamientos con fórmula de *PoGV* y una prueba control). La mayor concentración utilizada fue  $1,2 \times 10^9$  gránulos por gramo de arena, las subsiguientes 5 fórmulas con un factor de diferencia de concentración de 9 ( $1,2 \times 10^9$ ;  $1,33 \times 10^8$ ;  $1,48 \times 10^7$ ;  $1,65 \times 10^6$ ;  $1,83 \times 10^5$  y  $2,03 \times 10^4$  gránulos por g de arena). El número de repeticiones por cada tratamiento fue de 6 (50 individuos por repetición). Cada bioensayo tuvo una prueba control de talco (sin fórmula de *PoGV*) y otra sin aplicación alguna. La aplicación de fórmulas, inoculación, incubación y evaluación de bioensayos se hizo siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.6.4. Se hizo también un registro y recolección de larvas enfermas o muertas con el signo típico que produce el *PoGV*.

### **Bioensayos de actividad de *Btk* formulado en talco contra *P. operculella* y *S. tangolias***

Con la finalidad de determinar la curva de relación entre mortalidad y concentración de *Btk* sobre *P. operculella* y *S. tangolias*. Se infestaron con larvas neonatas tubérculos de papa (cultivar “Peruanita”) tratados con fórmula de DiPel 2X (*Btk*) en talco. Se realizaron 2 bioensayos con *P. operculella* y 3 con *S. tangolias*. Durante el primer bioensayo se utilizaron 6 fórmulas de concentraciones diferentes:  $3,2 \times 10^4$ ;  $8 \times 10^3$ ;  $2 \times 10^3$ ;  $5 \times 10^2$ ;  $1,25 \times 10^2$  y  $3,13 \times 10^1$  mg de DiPel 2X por kg de talco. En los siguientes bioensayos, solo 5 concentraciones fueron evaluadas:  $3,5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $2,85 \times 10^3$ ,  $8,16 \times 10^2$  y  $2,33 \times 10^2$  mg/kg de talco. Cada bioensayo tuvo una prueba control de talco (sin fórmula de entomopatógeno) y otra sin aplicación alguna. La aplicación de fórmulas, inoculación, incubación y evaluación de bioensayos se hizo siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.6.4.

### **Bioensayos de actividad de *Btk* formulado en arena contra *P. operculella* y *S. tangolias***

Con la finalidad de determinar la curva de relación entre mortalidad y concentración de *Btk* sobre *P. operculella* y *S. tangolias*. Se infestaron con larvas neonatas tubérculos de papa (cultivar “Peruanita”) tratados con fórmula de DiPel 2X (*Btk*) en arena según el procedimiento de aplicación de material inerte antes descrito. Se realizó 1 bioensayo con *P. operculella* y otro con *S. tangolias*. Durante el bioensayo se utilizaron 6 fórmulas de concentraciones diferentes:  $3,2 \times 10^4$ ;  $8 \times 10^3$ ;  $2 \times 10^3$ ;  $5 \times 10^2$ ;  $1,25 \times 10^2$  y  $3,13 \times 10^1$  mg de DiPel 2X por kg de arena. Cada bioensayo tuvo una prueba control con arena (sin fórmula de entomopatógeno) y otra sin aplicación alguna. La aplicación de fórmulas, inoculación, incubación y evaluación de bioensayos se hizo siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.6.4.

### 3.6.8. Interacción *PoGV* – *Btk* sobre *P. operculella*

Para la determinación de la interacción entre ambos entomopatógenos se realizaron 2 bioensayos con aplicación de suspensiones individuales y combinadas de *PoGV* y *Btk* (además de los 3 bioensayos individuales por cada agente, descritos en la sección 3.6.5). En ambos bioensayos las concentraciones en las suspensiones individuales de *PoGV* fueron:  $2,39 \times 10^8$ ;  $2,99 \times 10^7$ ;  $3,73 \times 10^6$ ;  $4,67 \times 10^5$  y  $5,83 \times 10^4$  gránulos por mL (factor de dilución = 8) y para las suspensiones individuales de *Btk* (DiPel 2X):  $4 \times 10^3$ ;  $8 \times 10^2$ ;  $1,6 \times 10^2$ ;  $3,2 \times 10^1$ , y 6,4 mg por litro (factor de dilución = 5) en el primer bioensayo y  $9,32 \times 10^2$ ;  $1,98 \times 10^2$ ;  $4,22 \times 10^1$ ; 8,97 y 1,91 mg por litro (factor de dilución = 4,7) en el segundo bioensayo. Cada suspensión individual de *PoGV* y *Btk* (desde la primera a la quinta dilución en ambos casos), fue utilizada para preparar 3 fórmulas combinadas de ambos patógenos por cada nivel de dilución; mezclando la suspensión de mayor concentración de *PoGV* con la de mayor concentración de *Btk* en las proporciones de: 1:3; 1:1 y 3:1; y sucesivamente se siguió el mismo procedimiento entre las subsiguientes diluciones de menor concentración. De tal forma que en cada bioensayo se prepararon 25 suspensiones diferentes (10 suspensiones con un solo entomopatógeno, sea *PoGV* o *Btk* y 15 suspensiones con la combinación de ambos). Cada suspensión se constituyó en un tratamiento para efectos de hacer la evaluación de la interacción entre *PoGV* y *Btk*. En ambos bioensayos a partir de cada tratamiento se instalaron 6 repeticiones, y por cada repetición se utilizaron 50 larvas neonatas.

Las suspensiones obtenidas sirvieron para ser aplicados a tubérculos de papa (cv “Peruanita”). El tratamiento de tubérculos, inoculación, incubación y evaluación de bioensayos se hizo siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.6.4.

### 3.6.9. Experimento en almacenes de papa

Se realizó en 15 almacenes de productores de papa ubicados en los distritos de Chongos, Ahuac, Marcatuna, Huachac y Vixo de la provincia de Huancayo en la Región Junín. Se instalaron 3 tratamientos (2 tratamientos con fórmula de patógenos y una prueba control sin aplicación alguna), con 50 kg de papa cada uno, en todos los almacenes. Las fórmulas que se evaluaron fueron dos: *Btk* que contenía 15 g de DiPel 2X por kg de talco y otra mixta *Btk* + *PoGV* que contenía 15 g de DiPel 2X y adicionalmente  $10^8$  gránulos de *PoGV* por gramo de talco. Las condiciones ambientales fueron las propias de la zona. La aplicación de las fórmulas fue en bolsas de plástico (75 × 100 cm). La evaluación de presencia de individuos (larvas y pupas) de *P. operculella* o *S. tangolias* se hizo a partir de muestras extraídas (5 kg de los tubérculos almacenados por cada tratamiento) el primer día (prueba control) y a los 81; 130; 160; 191 y 221 días de instalado el experimento.

#### Preparación de fórmulas de patógenos para uso en almacén

La preparación de fórmulas en talco para la aplicación de tubérculos en almacenes de productores de papa fue siguiendo el protocolo de producción de fórmulas de *PoGV* en talco a mediana escala desarrollado en el CIP. Para los fines del presente estudio se prepararon dos fórmulas, solo con *Btk* en talco (15 g de DiPel 2X por kg) y otra fórmula mixta que contenía *Btk* + *PoGV* (15 g de DiPel 2X +  $1 \times 10^8$  gránulos por kg) en talco. El proceso de producción de la fórmula mixta inició con la preparación de una suspensión de 4 litros de *PoGV* en agua destilada con una concentración de  $10^8$  gránulos por mL. La medición de la concentración fue mediante el método de la cámara de Neubauer (Sigma; 0,01 mm de profundidad) haciendo uso de un microscopio de contraste de fase (400×); y verificada por espectrofotometría como fue descrito por SPORLEDER *et. al.* (2005). A la misma suspensión se añadió 60 gramos de DiPel 2X, (15 g de DiPel 2X por litro). La



suspensión mixta fue mezclada con 4 kg de talco (1 kg por litro) en un recipiente de plástico hasta la formación de una mezcla de consistencia homogénea. La mezcla fue vertida, extendida en una superficie de plástico, sobre mesas de (2 × 3 m), y sometida finalmente a secado por 72 horas, en condiciones de temperatura ambiente sin exposición directa de luz solar. La mezcla seca fue pulverizada con ayuda de un rodillo de cocina, y finalmente embolsada en cantidades de 50 g para su aplicación en los bioensayos de almacén. Una segunda fórmula fue preparada siguiendo un procedimiento similar, esta vez solo con *Btk*. Además, se preparó una fórmula *PoGV+Btk* en arena ( $1 \times 10^8$  gránulos + 15 g de DiPel 2X por kg) que llegó a aplicarse solo en las pruebas de laboratorio, mas no así en los almacenes.

### **Aplicación de fórmulas en los almacenes de papa**

La aplicación de fórmulas de patógenos sobre los tubérculos a almacenar se hizo en bolsas de plástico transparente de 75 × 100 cm, donde fueron depositados 10 kg de papa y 50 gramos de fórmula en talco (5 g por kg de papa). La bolsa con su contenido luego fue cerrada para proceder a ser agitada manualmente y entre 2 personas hasta conseguir impregnación completa y homogénea de la fórmula sobre los tubérculos. La operación se repetía hasta completar los 50 kg. Los tubérculos tratados fueron colocados en superficies planas, un tratamiento al costado del otro, separados por maderas y libremente expuestos, sin cobertura alguna, en los lugares de almacenamiento que los productores tenían destinado para este fin.

### **Evaluación de los tratamientos en almacenes de papa**

Se hizo una evaluación preliminar del nivel de infestación inicial a partir de una muestra de 5 kg de papa extraída al momento de instalación (tratamiento control) por cada almacén. Los siguientes muestreos se hicieron al cabo de 30 y 81 días, seguidamente a los 130 días y

desde entonces un muestreo mensual (160; 191 y 221 días). Las muestras que se iban extrayendo fueron colocadas y cerradas en bolsas de papel. En todos los muestreos se extrajeron 5 kg de papa por cada tratamiento y fueron transportados luego al laboratorio de Entomología del CIP estación Santa Ana en Huancayo para la evaluación de la presencia de larvas y pupas de *P. operculella* y *S. tangolias*, 15 días después de cada muestreo. Las pupas y larvas encontradas fueron consideradas como individuos presentes por cada tratamiento.

### **3.6.10. Técnicas para el procesamiento de datos**

Para evaluar las diferencias estadísticas de mortalidad entre los tratamientos se utilizó análisis de varianza de 1 vía (ANOVA), además de la prueba de Levene antes del análisis para verificar homogeneidad de varianzas dentro de los tratamientos. Para determinar la relación de la concentración-mortalidad del sistema entomopatógeno-insecto se aplicó Análisis de Probit (FINNEY, 1971). Alternativamente se aplicaron los modelos Logit y CLL, y se seleccionó el más adecuado mediante evaluación de residuales y comparación de los criterios de información Akaike (AIC) (AKAIKE, 1973). Las respuestas de mortalidad (observados a partir de 4 - 6 repeticiones por concentración de entomopatógenos en cada bioensayo) fueron ajustados por la ecuación de Abbott (ABBOTT, 1925).

Las líneas de regresión Probit obtenidas, fueron comparadas por sus  $CL_{50}$  y pendientes respectivas. Los valores de potencia de la  $CL_{50}$  y sus límites de confianza al 95% fueron calculados, acorde a FINNEY (1971). Se aplicó un análisis de  $Chi^2$  para evaluar paralelismos en las líneas de regresión Probit y la heterogeneidad.

Para comparar los porcentajes de mortalidad esperada y observada por las mezclas en los bioensayos de interacción de entomopatógenos, se utilizó una prueba binominal adaptada por MCVAY *et al.* (1976), y modificada por FUXA (1979). Un análisis de regresión múltiple

fue realizado entre las variables independientes log-concentración de *PoGV* y log-concentración de *Btk* y los valores  $z$  obtenido a partir de una prueba binominal, como variable dependiente. Las diferencias entre mortalidad observada y esperada se consideraron significantes cuando los valores- $z$  se encontraron fuera del rango de -1,645 ( $B < 0,05$ ) a 1,645 ( $B > 0,95$ ). Los sinergismos se indicaron cuando los porcentajes de mortalidad observado fueron significativamente mayores que la mortalidad esperada a partir del modelo independiente. Cuando los porcentajes de mortalidad no fueron significativamente diferentes a las mortalidades esperadas a partir del modelo independiente, pero significativamente superiores que el esperado a partir del modelo aditivo el modo de interacción fue considerado independiente. Los porcentajes de mortalidad significativamente menores que las mortalidades esperadas a partir del modelo antagonista indicaron antagonismo entre ambos patógenos. La interacción aditiva se consideró cuando las mortalidades fueron significativamente inferiores que el esperado a partir del modelo independiente, significativamente superiores que el esperado a partir del modelo antagonista, pero no diferentes a partir de las mortalidades esperadas con el modelo aditivo. Un análisis de regresión múltiple fue realizado entre las variables independientes log-concentración de *PoGV* y log-concentración de *Btk* y los valores  $z$  obtenido a partir de una prueba binominal, como variable dependiente

Los datos obtenidos de los experimentos en campo (almacenes de papa) fueron sometidos a análisis de covarianza (ANCOVA). Para determinar el incremento de infestación en los tratamientos en cada almacén en función al tiempo, se utilizó una regresión no lineal entre la incidencia de la plaga (número de larvas y pupas) y el tiempo de almacenamiento. Para caracterizar el curso del tiempo de incremento de polilla de la papa se ajustó una curva de crecimiento exponencial mediante regresión no lineal por cada almacén y tratamiento.

Para los distintos análisis se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 12 y Programa R.

## IV RESULTADOS

### 4.1. MORTALIDAD NATURAL DE *P. operculella* Y *S. tangolias* EN LOS BIOENSAYOS

La mortalidad natural promedio que se presentó en *P. operculella* fue de 20,7%. El rango de sus promedios se presentó entre 44,9% (error estándar: 0,17%) a 11,1% (error estándar: 0,12%); con valores máximo y mínimo de 60% y 2%, respectivamente, en las unidades de evaluación. Las varianzas de mortalidad natural fueron homogéneas en los bioensayos (prueba de LEVENE:  $F = 1,36$ ;  $df = 25, 115$ ;  $p = 0,137$ ) y no fueron transformados para procesar ANOVA. La mortalidad entre los bioensayos vario significativamente (ANOVA:  $F = 10,7$ ;  $df = 25, 115$ ;  $p < 0,001$ ). En el 60% de los bioensayos, es decir 16 de 26 bioensayos, las respuestas de mortalidad natural promedio se presentaron entre 11,1% a 19,9%; las mismas que no presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre si (tabla 1).

La mortalidad natural promedio que se presentó en *S. tangolias* fue de 31,8%. El rango de promedios entre bioensayos fue entre 43,6% (error estándar de 0,12%) a 16,1% (error estándar de 0,12%), con valores máximo y mínimo de 56% y 10%, respectivamente, entre sus unidades de repetición. Se observó también al igual que en *P. operculella* alta variación en las respuestas de mortalidad (tabla 2). La varianza en las respuestas de mortalidad no fueron homogéneos en los bioensayos (prueba de LEVENE:  $F = 4,39$ ;  $df = 12, 115$ ;  $p < 0,05$ ). El 62% de los bioensayos, es decir 8 de 13 bioensayos, presentaron respuestas de mortalidad promedio entre 28,9% y 40,5%, los mismos que no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ) entre si (tabla 2).

Comparativamente la diferencia de mortalidad natural entre las dos especies fue 1,4 veces mayor en *S. tangolias* (31,8%) respecto a *P. operculella* (21,7%), bajo las condiciones brindadas para cada especie en los bioensayos.

## **4.2. ACTIVIDAD DE PATÓGENOS, APLICADOS EN SUSPENSIÓN ACUOSA A TUBÉRCULOS DE PAPA, SOBRE *P. operculella* Y *S. tangolias***

### **4.2.1. Actividad de *PoGV* sobre *P. operculella***

La exposición de larvas neonatas de *P. operculella* a *PoGV* en 5 bioensayos reveló pendientes estadísticamente similares y diferencias no significativas en los valores  $CL_{50}$  de sus respectivas 5 curvas de concentración-mortalidad Probit según los límites de confianza de sus potencias a nivel del 95% (tabla 3). Los valores de  $CL_{50}$  obtenidos se presentaron en el rango de  $9,95 \times 10^6$  a  $2,53 \times 10^7$  gránulos por mL. Debido a la gran heterogeneidad en las muestras ( $Chi^2 = 20,4$ ;  $df = 13$ ;  $p < 0,05$ ) se llevó a cabo una prueba de varianzas entre paralelismo y heterogeneidad confirmándose la existencia de paralelismos entre las líneas de regresión ( $F = 0,972$ ,  $df = 4, 13$ ,  $p = 0,456$ ). La mortalidad control varió desde 14 a 23% entre los bioensayos. La  $CL_{50}$  correspondiente al total de las muestras a partir de los 5 bioensayos fue  $1,55 \times 10^7$  gránulos/mL ( $IC_{95\%}$ :  $1,26 \times 10^7$ - $2,14 \times 10^7$ ). En la figura 8 se muestran las curvas respuesta de mortalidad en los 5 bioensayos. Estos resultados demuestran que no se presentaron variaciones significativas entre los bioensayos y que los resultados son repetibles mediante la técnica empleada.

### **4.2.2. Actividad de *Btk* sobre *P. operculella***

Para describir las curvas respuesta de concentración-mortalidad en larvas neonatas de *P. operculella* expuestas a *Btk* se utilizó el modelo CLL (Complementary Log-Log) por ser el más apropiado (según AIC). Las pendientes de regresión en los 5 bioensayos realizados fueron estadísticamente similares; debido a la heterogeneidad significativa en las muestras ( $<0,05$ ) se llevo a cabo una prueba de varianza para demostrar la igualdad de varianzas entre paralelismo y heterogeneidad, y en virtud a ello establecer que el paralelismo entre las líneas es verdadero ( $F = 1,382$ ;  $df = 4, 11$ ;  $p = 0,302$ ). Los valores de  $CL_{50}$  se presentaron

en el rango de  $1,32 \times 10^3$  mg DiPel 2X por litro (bioensayo 5) a  $2,53 \times 10^3$  mg DiPel 2X por litro (bioensayo 2). Solamente estos valores extremos fueron significativamente diferentes según los límites de confianza de sus potencias a nivel del 95% (tabla 4). La mortalidad control varió desde 14% a 22%. La  $CL_{50}$  correspondiente al total de las muestras a partir de los 5 bioensayos fue 1321 mg de DiPel 2X por litro ( $IC_{95\%}$ : 1084-1555), el mismo que es equivalente a  $4,23 \times 10^7$  UI de potencia por litro. Los porcentajes retransformados de mortalidad (encontrados y estimados) a partir del modelo CLL para las líneas de regresión individuales son presentados en el anexo (figura 9). Debido a que no se presentó variación significativa entre los resultados a partir de los diferentes bioensayos, se utilizó la pendiente común obtenida en el análisis para calcular las respuestas de mortalidad esperada producida por *Btk* en los tratamientos con combinación de patógenos correspondientes a los bioensayos 2 y 3 sobre interacción de patógenos.

#### 4.2.3. Actividad de *Btk* sobre *S. tangolias*

El modelo CLL mostró también ser el mas apropiado (de acuerdo a AIC) para describir las curvas de mortalidad-concentración en larvas expuestas a *Btk*. Las 3 curvas (CLL) de mortalidad-concentración revelaron pendientes estadísticamente idénticas y diferencias no significativas en los valores  $CL_{50}$  según los límites de confianza de sus potencias al nivel de 95% (tabla 5). Los valores de  $CL_{50}$  se presentaron en el rango de  $2,97 \times 10^3$  a  $3,63 \times 10^3$  mg de DiPel 2X por litro. Debido a la gran heterogeneidad en la muestra ( $Chi^2 = 15,6$ ,  $df = 7$ ,  $p = 0,03$ ) se llevó a cabo una prueba de varianzas entre paralelismos y heterogeneidad, confirmándose paralelismos entre las líneas de regresión ( $F = 0,877$ ;  $df = 2$ ;  $7$ ;  $p = 0,457$ ). Las mortalidades control observadas fueron 43,7; 32,5; y 33,5% en los bioensayos 1 a 3, respectivamente, los cuales en estimaciones revisadas resultaron 39,7% ( $\pm 1,52\%$ ); 30,6% ( $\pm 0,65\%$ ); y 34,6% ( $\pm 1,11\%$ ). Esto al parecer se debió a que la mortalidad control observada en el bioensayo 1 fue sobreestimada respecto de la tasa real de mortalidad

natural. Es decir, porque hubo menor mortalidad con la concentración más baja de *Btk* comparado al control (figura 10), siendo esta la responsable de la gran heterogeneidad observada en el bioensayo 1. Fuera de esta dudosa estimación de mortalidad control observada en el primer bioensayo, los resultados mostraron ausencia de variación significativa entre los bioensayos y son repetibles mediante la técnica empleada. La  $CL_{50}$  correspondiente al total de las muestras a partir de los 3 bioensayos fue 3095 mg DiPel 2X por litro ( $IC_{95\%}$  1711 - 3575), el mismo que es equivalente a  $9,90 \times 10^7$  UI de potencia por litro. Los porcentajes retransformados de mortalidad (encontrados y estimados) a partir del modelo CLL para las líneas de regresión individuales son presentados en el anexo (figura 10).

#### **4.3. ACTIVIDAD DE MATERIALES INERTES, APLICADOS A TUBÉRCULOS DE PAPA, SOBRE *P. operculella* Y *S. tangolias***

##### **4.3.1. Actividad de talco, caolín, cal y arena sobre *P. operculella* y *S. tangolias***

Los incrementos en la dosis de aplicación de material inerte (talco, caolín cal y arena) produjeron también incrementos diversos de mortalidad larval de *P. operculella* y *S. tangolias* cuando fueron inoculadas en estadio neonatal sobre tubérculos de papa tratados con estos materiales. El modelo que describió mejor los efectos letales de los tratamientos contra larvas neonatas de *P. operculella* y *S. tangolias* (figura 11, figura 12, figura13 y figura14) fué el Probit.

Las curvas de mortalidad que se obtuvieron a partir de los diferentes bioensayos fueron significativamente paralelas para cada uno de los materiales inertes: talco ( $Chi^2 = 0,34$ ;  $df = 2$ ;  $p = 0,845$ ), caolín ( $Chi^2 = 0,83$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,3625$ ), cal ( $Chi^2 = 0,48$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,4878$ ) y arena ( $Chi^2 = 0,75$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,3855$ ). Debido a la gran heterogeneidad dentro de la muestras en los bioensayos con talco ( $Chi^2 = 3,32$ ;  $df = 9$ ;  $p < 0,01$ ) una prueba de

proporciones de varianza entre paralelismo y heterogeneidad respaldó la idea del paralelismo entre las líneas de regresión ( $F = 0,051$ ;  $df = 2$ ;  $9$ ;  $p = 0,951$ ). En los demás casos la heterogeneidad no fueron significantes: caolín ( $Chi^2 = 0,36$ ;  $df = 6$ ;  $p = 0,9059$ ), cal ( $Chi^2 = 0,35$   $df = 6$ ;  $p = 0,9083$ ) y arena ( $Chi^2 = 0,17$   $df = 6$ ;  $p = 0,9853$ ); finalmente para estos materiales una prueba de proporciones de varianza entre el paralelismo y heterogeneidad respaldó la idea del paralelismo entre las líneas de regresión: caolín ( $F = 2,317$ ;  $df = 1$ ;  $6$ ;  $p = 0,179$ ), cal ( $F = 0,367$ ;  $df = 1$ ;  $6$ ;  $p = 0,287$ ) y arena ( $F = 4,482$ ;  $df = 1$ ;  $6$ ;  $p = 0,079$ ). Por consiguiente, ambas especies son igualmente sensibles al cambio de dosis frente a todos los materiales inertes.

La  $DL_{50}$  de talco para *S. tangolias* (2,25 g de talco por kg de papa) fue significativamente menor que el de *P. operculella* (9,9 y 5,8 g por kg de papa en los bioensayos 1 y 2) (tabla 6). El 95% de los límites de confianza para sus potencias revelaron diferencias significativas en la actividad del talco entre los tres bioensayos. Sin embargo, las diferencias de potencias entre los 2 bioensayos con *P. operculella* fueron relativamente pequeñas (1,7 veces mayor eficiencia en el bioensayo 2 a comparación del bioensayo 1). Mientras las larvas neonatas de *S. tangolias* (bioensayo 3) fueron 4,4 y 2,7 veces más susceptibles a los tratamientos con talco cuando fueron comparados a los bioensayos 1 y 2 con *P. operculella* respectivamente. Las mortalidades control fueron 11 a 15% en *P. operculella* y 16% para *S. tangolias*; relativamente bajos comparado a resultados previos.

Por otra parte, la  $DL_{50}$  del caolín para *S. tangolias* (11,7 g de caolín por kg de papa) fue significativamente menor que el de *P. operculella* (79,4 g de caolín por kg de papa) (tabla 7). La  $DL_{50}$  de cal para *S. tangolias* (10 g de cal por kg de papa) fue significativamente menor que para *P. operculella* (62,8 g de cal por kg de papa) (tabla 8). En tanto que, la  $DL_{50}$  de la arena, estimada por el modelo Probit, para *S. tangolias* ( $2,65 \times 10^5$  g de arena por kg de papa) no fue significativamente menor que el de *P. operculella* ( $9,73 \times 10^5$  mg de



arena por kg de papa) (tabla 9). El 95% de los límites de confianza para sus potencias revelaron diferencias significativas entre los bioensayos con caolín y cal, mas no así entre las de arena. Las larvas neonatas de *S. tangolias* fueron más susceptibles a los tratamientos con: caolin (6,8 veces), cal (6,25 veces) y arena (3,7 veces); cuando fueron comparados a *P. operculella*.

Las aplicaciones de 15 g de material inerte por kg de papa pueden ser considerados como la máxima dosis aplicable en todos los casos (a mayores dosis no hay mayor adherencia sobre los tubérculos y la aplicación se hace más prolongada). Con esta máxima dosis de materiales inertes fueron posible obtenerse, frente a *S. tangolias* y *P. operculella* respectivamente en cada caso, mortalidades cercanas al: 85% y 65% (talco); 60% y 20% (caolín); 60% y 25% (cal); 15% y 12% (arena). Del mismo modo frente a ambas especies, utilizando la dosis tradicional de 5 g de talco por kg de papa, representan en teoría aproximadamente: 66% y 40% (talco); 32% y 7% (caolín); 36% y 9% (cal); 13% y 10% (arena) respectivamente (figura 11); (figura 12); (figura 13).

#### **4.3.2. Comparación de la actividad de aplicaciones con materiales inertes a dosis constante y según tipo de inoculación, sobre larvas de *P. operculella* y *S. tangolias***

El análisis en conjunto de los datos mostraron diferencias significantes en las respuestas observadas de mortalidad entre ambas especies (ANOVA:  $F = 26,101$ ;  $gl = 1$ ;  $p < 0,05$ ), resultando *S. tangolias* significativamente más susceptible que *P. operculella* a los diferentes materiales inertes. El efecto de los materiales inertes también produjo diferencias significantes de mortalidad ( $F = 54,816$ ;  $gl = 1$ ;  $p < 0,05$ ). Según la prueba de Tukey solo el polvo de arena no presentó diferencias con la prueba control, en tanto la cal lo hizo respecto a todos los demás tratamientos y finalmente no hubo diferencias significantes entre el talco y caolín (tabla 10). Respecto al tipo de inoculación los índices de mortalidad fueron

significativamente mayores en la inoculación por exposición de huevos que en la de larvas ( $F = 36,409$ ;  $gl = 1$ ;  $p < 0,05$ ).

Las interacciones por pares de factores independientes sobre la supervivencia también mostraron diferencias significativas en la mortalidad ( $p < 0,001$ ); sin embargo, la interacción entre todos los factores independientes no mostró diferencias significativas ( $p = 0,150$ ) (figura 15).

#### **4.4. ACTIVIDAD DE FÓRMULAS DE *PoGV* Y *Btk* EN POLVO**

##### **4.4.1. Actividad de *PoGV* formulado en talco y polvo de arena sobre *P. operculella***

La exposición de larvas neonatas de *P. operculella* a aplicaciones de tubérculos de papa con fórmulas de *PoGV* en talco y arena, a partir de 2 bioensayos revelaron además de pendientes estadísticamente similares, diferencias significativas en los valores  $CL_{50}$  de sus respectivas curvas de concentración y mortalidad Probit según los límites de confianza de sus potencias a nivel del 95% (tabla 11). Los valores de  $CL_{50}$  obtenidos fueron  $6,22 \times 10^7$  gránulos por g de fórmula en arena y  $1,03 \times 10^6$  gránulos por g de fórmula en talco. Debido a la no significancia de heterogeneidad en las muestras ( $Chi^2 = 10,78$ ;  $df = 6$ ;  $p = 0,096$ ). Una prueba de varianzas entre paralelismo y heterogeneidad confirmó la existencia de paralelismos entre las líneas de regresión ( $F = 2,420$ ;  $df = 1$ ;  $6$ ;  $p = 0,171$ ). En el bioensayo con fórmula de *PoGV* en talco, la mortalidad control sin aplicación de material inerte (mortalidad natural) fue de 35% mientras que en el control con aplicación material inerte (sin fórmula de patógeno) fue de 66%; significando una mortalidad adicional por efecto del talco de 43%. En tanto que, en el bioensayo con fórmula de *PoGV* en arena, la mortalidad control sin aplicación de material inerte (mortalidad natural) fue de 14,5% y en el control con aplicación de material inerte (sin fórmula de patógeno) fue de 19%; significando una mortalidad adicional por efecto de la arena de 4,5%. Las larvas de *P. operculella* fueron 60

veces más susceptibles a las fórmulas con talco cuando fueron comparados a las de arena (figura 16). Así mismo, al ser comparados frente a la  $CL_{50}$  observada con las aplicaciones de este patógeno en suspensión acuosa ( $1,65 \times 10^7$  gránulos por mL) las concentraciones de *PoGV* necesarias para alcanzar el mismo nivel de respuesta fueron aproximadamente 3,7 veces mayor con la fórmula en arena y 16 veces menor en la de talco.

#### 4.4.2. Actividad de *Btk* formulado en talco sobre *P. operculella* y *S. tangolias*

La mortalidad en todos los tratamientos con talco fueron relativamente elevados. Debido a esto resultó difícil calcular los valores de  $CL_{50}$  (tabla 12 y figura 17). Considerando que solo el talco (sin fórmula) llegó a incrementar significativamente la mortalidad larval de *P. operculella* y *S. tangolias* (ANOVA:  $F = 42,1$ ;  $df = 1$ ; 38;  $p < 0,001$ ); presentándose además variación significativa importante de la mortalidad control entre los bioensayos ( $F = 8,3$ ;  $df = 4$ , 38,  $p < 0,001$ ); mientras las diferencias de mortalidad entre *P. operculella* y *S. tangolias* no fueron significativas ( $F = 0,084$ ;  $df = 1$ ; 44;  $p = 0,773$ ). Para *P. operculella* la mortalidad en los controles sin tratamiento fueron 30% y 45% en los bioensayos 1 y 2, mientras la mortalidad en el control con talco sin fórmula llegó al 74% y 84%. Esto significó una mortalidad adicional de 62% y 71% debido a la aplicación del talco sin *Btk*. *S. tangolias* respondió con 29%, 44% y 29% de mortalidad sin tratamiento alguno, mientras las mortalidades en el control con talco sin *Btk* fueron 72%, 58%, y 45% en los bioensayos 1 a 3. Por lo tanto, las mortalidades correspondientes debido a la aplicación del talco fueron bajos comparados a *P. operculella* y extremadamente bajos durante el bioensayo 3 (61%, 54% y 23%), (figura 17). Las curvas de concentración de *Btk* en talco y mortalidad para *S. tangolias* y *P. operculella* mostraron gran heterogeneidad ( $Chi^2 = 39,1$ ;  $df = 13$ ;  $p < 0,001$ ), pero las varianzas entre la heterogeneidad y el paralelismo fueron similares ( $F = 0,724$ ;  $df = 4$ ; 13;  $p = 0,591$ ). Por lo tanto el paralelismo fue asumido y una sola pendiente contenía los datos (tabla 12). Resultando los valores de  $CL_{50}$  para *P. operculella* en los dos bioensayos

estadísticamente similares (215 y 265 mg DiPel 2X por kg de talco). Sin embargo, probablemente por la elevada mortalidad control durante el segundo bioensayo, la heterogeneidad y por consiguiente las bandas de confianza de la potencia para el valor de  $CL_{50}$  fueron muy grandes. Los valores de  $CL_{50}$  para *S. tangolias* fueron más variables con 833; 1790 y 14900 mg/kg. Estos valores fueron significativamente diferentes a partir de la  $CL_{50}$  obtenida para *P. operculella* durante el bioensayo 1 (tabla 12). La  $CL_{50}$  para *S. tangolias* durante el bioensayo 3 fue extremadamente alta, y la actividad biológica de *Btk* resultó ser significativamente baja comparada a bioensayos previos con *S. tangolias*. Una posible razón sería que el producto no haya sido aplicado sobre los tubérculos con el mismo cuidado que en los bioensayos previos (cobertura insuficiente). La baja mortalidad control observada durante este bioensayo respalda esta idea. Las larvas generalmente ingresan a través de las yemas de los tubérculos de papa y estos al parecer no estuvieron apropiadamente cubiertos por el producto, conduciendo a una elevada supervivencia en el control con talco y baja actividad biológica del *Btk* en el producto en el último bioensayo. Al ser comparadas frente a las respectivas  $CL_{50}$  observadas con las aplicaciones de este patógeno en suspensión acuosa (1321 mg por litro para *P. operculella* y 3095 mg por litro contra *S. tangolias*) las concentraciones de *Btk* necesarias en la fórmula para alcanzar el mismo nivel de respuesta fueron aproximadamente 5 - 6 veces menor contra *P. operculella* y 2 - 4 veces menor ante *S. tangolias*.

#### **4.4.3. Actividad de *Btk* formulado en polvo de arena sobre *P. operculella* y *S. tangolias***

Considerando que la arena (sin patógeno) incrementó significativamente la mortalidad larval de *P. operculella* y *S. tangolias* (ANOVA:  $F = 39,965$ ;  $df = 1; 16$ ;  $p < 0,05$ ); presentándose además variación significativa de la mortalidad entre ambos bioensayos ( $F = 69,247$ ;  $df = 1; 16$ ;  $p < 0,05$ ); mientras que las diferencias de mortalidad entre *P. operculella* y *S. tangolias* también fueron significativas ( $F = 69,247$ ;  $df = 1; 16$ ;  $p < 0,05$ ). Las curvas

de concentración de *Btk* en arena y mortalidad para *S. tangolias* y *P. operculella* no mostraron heterogeneidad ( $Chi^2 = 6,49$ ;  $df = 4$ ;  $p = 0,1652$ ), las varianzas entre la heterogeneidad y el paralelismo fueron similares ( $F = 6,457$ ;  $df = 1$ ;  $4$ ;  $p = 0,064$ ). Por lo tanto fue asumido el paralelismo y una sola pendiente contenía los datos (tabla 13). Resultando el valor de  $CL_{50}$  para *P. operculella* 981 mg DiPel 2X por kilogramo de fórmula en arena (equivalente a  $3,14 \times 10^7$  UI de potencia por kg). El valor de  $CL_{50}$  para *S. tangolias* fue 2001 mg por kg (equivalente a  $6,40 \times 10^7$  UI de potencia por kg de fórmula). La potencia de *Btk* sobre *S. tangolias* resultó ser 50% menos efectiva, resultando significativamente diferente respecto a la  $CL_{50}$  obtenida para *P. operculella* según los límites de confianza al nivel de 95% (tabla 13) (figura 18). Al hacer comparaciones frente a las respectivas  $CL_{50}$  observadas con las aplicaciones de este patógeno en suspensión acuosa (1321 mg por litro para *P. operculella* y 3095 mg por litro contra *S. tangolias*) las concentraciones de *Btk* necesarias en la fórmula, para alcanzar el mismo nivel de respuesta fue aproximadamente 1,3 veces menor contra *P. operculella* y 1,5 veces menor ante *S. tangolias*.

#### 4.5. INTERACCIÓN DE *Btk* y *PoGV* en *P. operculella*

Las  $CL_{50}$  de *PoGV* y *Btk* individual han sido descritas en la sección 4.2; luego se utilizó pruebas de *Chi* cuadrado y test binominal para comparar los porcentajes de mortalidad observada y esperada en las diferentes mezclas, y así probar tres hipótesis diferentes respecto al modo de acción de una mezcla determinada (sinérgico, aditivo y antagonístico).

Los cálculos de las respuestas de mortalidad combinada esperada se basaron en el modelo CLL obtenido individualmente para cada agente patógeno. Para *PoGV*, las ecuaciones de regresión usando la pendiente común, fueron utilizadas como se indica en la tabla 3. Sin embargo, debido a la gran heterogeneidad en las pendientes de las 5 líneas de regresión de

*Btk* individual (las pendientes individuales de los bioensayos en especial el 2 y 3 variaron ampliamente de la pendiente común) (tabla 4), y la relativa alta heterogeneidad en los datos obtenidos a partir de los tratamientos con *Btk* en los bioensayos con combinación de patógenos (bioensayo 2 y 3); se calcularon las mortalidades esperadas por *Btk* basado en las líneas individuales ajustadas a los datos.

Según la prueba binominal, las interacciones entre *PoGV* y *Bt* fueron mixtas (tabla 14 y tabla 15), pero con tendencia al antagonismo. Los efectos sinérgicos fueron solamente observables cuando las larvas estuvieron expuestas a bajas concentraciones de ambos patógenos. El antagonismo (tabla 14 y tabla 15) se hizo notar especialmente cuando se utilizó *Btk* en concentraciones mayores a la  $CL_{30}$  en la mezcla. Sin embargo, mayores tasas de *PoGV* incrementan la mortalidad combinada obtenida a partir de las mezclas. Por ejemplo, las interacciones en el grupo de mezclas 3:1 (*PoGV:Btk*) tienden hacia la interacción independiente, mientras la interacción en el grupo de mezclas 1: 3 tienden hacia el antagonismo. Los coeficientes de regresión estandarizado (coeficientes beta) (tabla 16) obtenidos a partir de análisis de regresión múltiple, utilizando el logaritmo de concentración de los dos patógenos como variables independientes y los valores  $z$  obtenidos a partir de una prueba binominal (modelo independiente) como la variable dependiente, revelaron un efecto negativo significativo sobre la mortalidad combinada por incremento de la concentración de *Btk* ( $\beta = -0,472$ ;  $p < 0,001$ ), pero no por incremento de la concentración de *PoGV* ( $\beta = 0,164$ ;  $p = 0,141$ ). Los coeficientes de correlación parcial; es decir, la fuerza de la relación entre concentración de un patógeno y los valores  $z$ , cuando son mantenidos constantes los efectos de la concentración de un segundo patógeno; demostraron que *Btk* reduce la mortalidad combinada con concentraciones crecientes ( $r_{\text{parcial}} = -0,306$ ), mientras el incremento de concentración de *PoGV* conduce a mortalidades combinadas ligeramente mayores ( $r_{\text{parcial}} = 0,111$ ) (tabla 16; figura 19 y figura 20). Esto

sugiere que aplicaciones simultáneas de *PoGV* y *Bt* parecen no ser un enfoque viable para el control de *P. operculella*.

#### 4.6. EXPERIMENTOS EN ALMACENES RURALES

Para conocer la actividad sobre *P. operculella* y *S. tangolias* de los productos formulados a aplicarse en los almacenes de agricultores productores de papa en Huancayo, se llevó a cabo preliminarmente un bioensayo, bajo condiciones de laboratorio. Según la prueba de ANOVA se encontraron diferencias significantes en el número de pupas o sobrevivientes durante las evaluaciones por efecto de los tratamientos aplicados (fórmulas de patógenos en talco y arena además de la pruebas control) ( $F = 236,465$ ;  $df = 5$ ;  $p < 0,001$ ); y también entre ambas especies ( $F = 25,376$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0,001$ ) (tabla 17). Según la prueba de TUKEY no hubo diferencias significantes sobre la supervivencia (5-6% pupas en *P. operculella* y 1-5% en *S. tangolias*) por efecto de los productos formulados *Btk* + *PoGV* en talco ( $1 \times 10^8$  gránulos + 15 g de DiPel 2X por kg) y *Btk* en talco (15 g de DiPel 2X por kg), además de la fórmula *Btk* + *PoGV* en arena (15 g de DiPel 2X +  $1 \times 10^8$  gránulos por kg), que no llegó a utilizarse en los almacenes. Estos tratamientos a su vez mostraron diferencias significantes respecto a las pruebas control con y sin aplicación de material inerte. Los niveles de mortalidad alcanzada por efecto de las fórmulas, transformados mediante la ecuación de Abbott (ABBOTT, 1925) inicialmente utilizando la mortalidad natural y luego por sus respectivos controles de material inerte; en condiciones de laboratorio fueron elevados; siendo estas en *P. operculella* 93,6; 91,8 y 88,7%; y en *S. tangolias* 98,9; 91,2 y 89,2% frente a las fórmulas de *Btk*+*PoGV* en arena; *Btk* +*PoGV* en talco y *Btk* en talco respectivamente.

En los bioensayos de campo, ambas especies *P. operculella* y *S. tangolias* estuvieron presentes en los 15 almacenes de papa de agricultores, sin embargo *P. operculella* fue

hallada en cantidades muy bajas a través de las evaluaciones (generalmente < de 2 larvas o pupas por cada 100 tubérculos). *S. tangolias* fue la especie dominante en los 15 lugares de almacenamiento. La incidencia de la plaga aumentó exponencialmente con el mismo coeficiente de incremento relativo,  $b = 0,024$  (error estándar  $\pm 0,002$ ); en todos los almacenes (tabla 18). Este coeficiente común fue altamente significativo ( $p < 0,001$ ) e indicaría el índice natural de incremento poblacional de *S. tangolias* bajo condiciones de almacenamiento sin aplicación de medidas de control en Huancayo. El valor del coeficiente significó un tiempo de duplicación poblacional de 28,4 días, con un error estándar de 2,55. Sin embargo, los niveles iniciales de infestación variaron significativamente entre los almacenes, y por lo tanto la dimensión con la cual incrementó la infestación a lo largo del tiempo mostró gran variación. Solamente cuando la infestación inicial fue muy baja, es decir menor a 3 larvas o pupas por cada 100 tubérculos, las líneas de regresión encontradas fueron no significativas (tabla 18). En todos los demás casos se obtuvieron líneas de regresión altamente significativas, utilizando el coeficiente común de incremento. Los tratamientos con fórmulas de patógenos, disminuyeron la infestación inicial, es decir redujeron los niveles de infestación al cabo de la segunda evaluación, 30 días después de la aplicación, y protegieron los tubérculos por aproximadamente 90 días. Después de los 90 días la infestación de los tubérculos incrementó exponencialmente como en los controles con coeficientes similares (figura 21). Los niveles finales de infestación después de 170 días de almacenamiento fueron significativamente menores (alrededor de 4 – 5 veces) en los tubérculos tratados, es decir promedios de infestación cercanos a 35 larvas o pupas por cada 10 tubérculos comparado con el promedio cercano a 150 larvas o pupas en los controles sin tratamiento.



## V DISCUSIÓN

La mayoría de las respuestas de mortalidad natural promedio (en 15 bioensayos) de *P. operculella* se presentaron en el rango 11,1% a 19,9%, sin diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre si; con un promedio de 15,05% para este grupo de bioensayos (tabla 1). Si bien este promedio es diferente al 20% que se encontró para la totalidad de 26 bioensayos (141 repeticiones) es similar al 15% reportado por SPORLEDER (2003) a partir 6 bioensayos (24 repeticiones) con variaciones entre 10% a 25%; empleando para este efecto técnicas similares de conducción en los bioensayos. Se ha observado entonces comportamiento similar en la mayoría de bioensayos para esta especie y replicabilidad en el tiempo. Probablemente la diferencia entre las respuestas de mortalidad observados y desde luego sobre la variabilidad, tiene que ver el número de bioensayos realizados, siendo alrededor de 6 veces mayor la cantidad de datos analizados respecto a los de SPORLEDER (2003). Las respuestas de mortalidad tuvieron variaciones considerables, tal cual fuese reportado también por SPORLEDER (2003) en sus estudios. Aún con estas diferencias se puede afirmar que las poblaciones de polilla en los ambientes de crianza del CIP-La Molina, han logrado una buena adaptación y alcanzado comportamiento estable en los bioensayos, gracias a la aplicación de protocolos estandarizados y optimizados durante varios años.

Las respuestas de mortalidad natural promedio en *S. tangolias* se encontraron en el rango de 15 a 45% aproximadamente, con un promedio total de 32% (tabla 2) y fueron similares a los 16% y 44% reportados por LAGNAOUI *et al.* (2000) ó los 35% y 54% de ÁNGELES Y ALCÁZAR (1996) a partir de 2 bioensayos en cada caso utilizando técnicas similares de evaluación de pruebas control. La cantidad de datos analizados en el presente estudio (60 repeticiones) fueron al menos 7 veces mayor respecto a los evaluados por los investigadores mencionados; observándose variaciones y respuestas de mortalidad natural similares. Los márgenes de mortalidad natural y variabilidad fueron más amplios en *S. tangolias* respecto

a *P. operculella*. Estas respuestas en la mortalidad natural que tenían que ser usadas para ajustar las respuestas de mortalidad entre los tratamientos en los análisis de Probit variaron excesivamente para las dos especies.

Durante la evaluación de los bioensayos se observaron respuestas de mortalidad natural elevadas en ambas especies. En cuatro bioensayos (15% del total) las respuestas de mortalidad de *P. operculella* fueron en promedio 40%. En tanto que para *S. tangolias*, se observó que en siete bioensayos (53,3% del total) tuvieron un promedio de 45%. Estas respuestas pudieron deberse entre otros factores a descuidos en la manipulación del material biológico durante la ejecución de los bioensayos, incluyendo procedimientos en etapas previas; es decir, las que corresponden a los ambientes de crianza de polilla que tienen por finalidad producir, almacenar y proporcionar para la utilización en bioensayos los huevos (posturas) de ambas especies. En estas instancias podemos citar algunos factores como el tiempo y condiciones ambientales de almacenamiento de los huevos, siendo recomendable para disminuir su efecto como fuente de variabilidad evitar el almacenamiento de los huevos de tal forma que, apenas sean recolectados los discos adheridos con huevos en las cámaras de oviposición se incuben bajo las mismas condiciones en las que se han de desarrollar los bioensayos, evitando someterlos a temperaturas bajas de almacenamiento, aunque sean por breve tiempo. Otro factor importante de variabilidad que no ha sido medido pero que se ha prestado atención y debe ser considerado es el tiempo de incubación de los huevos, sobre todo considerando que aun cuando los discos de oviposición corresponden a un mismo día de recolección (con una diferencia por lo tanto en tiempo de oviposición de hasta 24 horas), la eclosión puede darse con algunos minutos de diferencia hasta incluso días (hasta 2 días al menos). Esta diferencia de tiempo hace que al transcurrir más de 4 horas desde la eclosión y mientras no se realice la instalación del bioensayo

disminuya la vitalidad de las larvas neonatas, en tanto no tienen posibilidad de recibir aporte energético por alimentación.

Otros factores que contribuyen a la variabilidad pueden darse en la etapa de bioensayos propiamente. La selección de larvas neonatas al realizar la infestación de tubérculos es un punto importante; siendo preciso elegir aquellas con las mejores características de vitalidad, como tamaño y agilidad de movimientos. De no tenerse cuidado en estos criterios el investigador puede aportar más fuentes de variabilidad. La muerte de larvas en los primeros estadíos, no solo puede darse por las condiciones ambientales del bioensayo, sino también por situaciones accidentales debidas a aplastamiento de los mismos por rodamiento y fricción entre tubérculos en los envases de bioensayo o contra las paredes de estas, sobre todo cuando se manipula, transporta o colocan en los lugares finales de incubación, por lo que siempre se ha evitado desplazamientos innecesarios del material biológico en evaluación. La fuga de larvas desde el interior de los envases de bioensayo es otro factor que puede presentarse de manera no advertida en algún caso a través de las áreas de ventilación, sobre todo cuando los envases han sido usados varias veces. Durante la evaluación final algunas pupas pueden también pasar inadvertidas sobre todo cuando se formaron al interior de los tubérculos; este factor se minimizó haciendo cortes en los tubérculos al final de la evaluación. Los factores mencionados que no deben ser significativos han contribuido en diferente magnitud sobre la variabilidad, especialmente en aquellos bioensayos donde se reportaron mayores niveles de mortalidad. DÍAZ *et al.* (2004) identificaron como fuentes de variabilidad, la selección de organismos de prueba, la variabilidad natural de las poblaciones, el estado fisiológico de los individuos y las condiciones ambientales mantenidas durante los bioensayos; reconocieron además su importancia en el aumento de variabilidad en los resultados, que puede llegar a ser muy alta entre bioensayos EVANS Y SHAPIRO (1987). Aun cuando el objetivo de las técnicas de

bioensayos es disminuir la variabilidad e incrementar la precisión como mencionan BURGESS Y THOMPSON (1971) estos serán siempre solo objetivos por alcanzar.

Las diferencias de mortalidad natural encontradas entre ambas especies de polilla podrían también deberse a su grado de adaptación en los sistemas de crianza. A comparación de *P. operculella* la especie *S. tangolias* parece ser más exigente respecto a condiciones ambientales, por provenir de zonas más frías, y además por que su crianza ha tenido un menor tiempo de implementación por su posterior aparición como plaga de importancia en cultivos de papa. Otra desventaja de *S. tangolias* es su ciclo de vida más largo a comparación de *P. operculella* que hace más difícil su adaptación e incremento poblacional en crianza, limitando su aprovisionamiento como material biológico. Estos aspectos de ser manejados mas óptimamente podrían reducir las diferencias de mortalidad de *S. tangolias*, ya que en algunos bioensayos fueron menores y cercanos (16 – 24%) al promedio de *P. operculella* (20%) (tabla 1 y tabla 2).

La aplicación de entomopatógenos en suspensión acuosa disminuye la posibilidad de variabilidad debido al consumo o ingestión de partículas virales o entomopatógenos por parte de los insectos plaga, gracias a que se consigue una cobertura homogénea en la superficie (MARTIGNONI E IWAI, 1978) de exposición. Esta característica de cobertura ha sido suficientemente alcanzada por la inmersión de tubérculos en la suspensión de *PoGV* o *Btk*, es entonces esta propuesta de uso en bioensayos un buen método de estandarización para conocer la eficiencia real de los preparados.

EVANS Y SHAPIRO (1997) señalaron que la variabilidad entre bioensayos es usualmente muy alta. Existe variabilidad en los procedimientos de administración de dosis, la selección de microorganismos de prueba. Ciertamente la variabilidad en la superficie de contaminación con patógenos en los bioensayos, donde los insectos evaluados pueden no consumir la dosis

completa es alta. Obviamente son muchos los factores que tienen influencia sobre la respuesta de los insectos ante las infecciones. La estandarización de bioensayos con insecticidas bacterianos es discutida con detalle por BURGESS Y THOMPSON (1971). Ellos señalaron que el objetivo de las técnicas de bioensayos sería disminuir la variabilidad e incrementar la precisión. En el caso de las pruebas de toxicidad, la calidad analítica es un reto complejo, porque no sólo los factores mencionados anteriormente afectan la confiabilidad de los resultados, sino que además otra serie de factores como la variabilidad natural de las poblaciones de prueba, el estado fisiológico de los individuos o las condiciones ambientales mantenidas durante las determinaciones, pueden contribuir a aumentar la variabilidad de los resultados (DÍAZ *et al.* 2004).

El método empleado en el presente bioensayo tiene una variación en la forma de aplicación y exposición de los entomopatógenos a las larvas respecto al método de inmersión de huevos. Al respecto, BURGESS Y THOMPSON (1971) consideran como ventajas del método de inmersión de huevos su muy elevada precisión y sencillos requerimientos de manejo. Estas ventajas pueden también ser del método de aplicación por inmersión de tubérculos en suspensión acuosa de patógenos; debido a que empleando el método de inmersión de huevos, una fuente de variabilidad sería la posibilidad de que en la eclosión las larvas consumirían cantidades variables de corion impregnadas de entomopatógeno (SPORLEDER, 2003), mientras en la aplicación por inmersión de tubérculos, la cantidad de entomopatógenos ingeridos por las larvas a partir del punto de ingreso en la superficie del tubérculo tratado sería menos variable por la cobertura homogénea del patógeno. Los valores  $CL_{50}$  casi constantes entre los bioensayos muestran que la variabilidad entre ellos es despreciable, situación también presente en los resultados obtenidos por SPORLEDER (2003) respecto a sus valores de  $CL_{50}$  empleando el método de inmersión de huevos. Otra fuente de variabilidad tendría lugar en la determinación correcta de las concentraciones aplicadas.

SPORLEDER (2003), reconoce como factor de variabilidad en sus trabajos la elevada mortalidad natural del hospedero. Asumiendo que el índice promedio de mortalidad natural real para nuestros bioensayos fue 21% y que estas observaciones siguen la distribución de Poisson, significa que en una muestra de 50 individuos solo el 15% de las observaciones mostraron 40 – 39 sobrevivientes (lo que corresponde a 20 – 22% de mortalidad natural); mientras que en el 41% y 44% mostraron mayor y menor número de sobrevivientes respectivamente. Esta misma situación también podría ser descrita en el caso de *S. tangolias* por su elevada mortalidad natural. Considerando que para esta especie el índice promedio de mortalidad natural fue 32%, significando que de una muestra de 50 individuos solo el 20% de observaciones mostraron 34 – 35 sobrevivientes (30 – 32% de mortalidad natural); mientras que en el 45% y 35% se encontraron respectivamente el mayor y menor número de sobrevivientes. A causa de la elevada mortalidad natural del hospedero parecería adecuado tomar las mortalidades Probit como el promedio de 4 - 6 repeticiones con 50 individuos por cada concentración. Sin embargo, resulta importante para mantener baja la mortalidad natural utilizar huevos “frescos”.

EVANS Y SHAPIRO (1997) notaron que la variabilidad entre ensayos suele ser muy grande. HUNTER-FUJITA *et al.* (1998) mencionaron además, que esto tiene que ver con el grado de adiestramiento que se alcanza al llevar a cabo los bioensayos, a partir de una serie de 20 bioensayos usando GV de polilla negra diamante *Plutella xylostella* L. (Lepidóptera., Plutellidae), llevado a cabo en un periodo de 2 años. En el primer año el rango de CL<sub>50</sub> que había encontrado fue de 4,07 a 7,5, mientras en el segundo año las CL<sub>50</sub> se estabilizaron alrededor de 6,1 con una reducción significativa en la desviación estándar de la muestra y error estándar Probit.

Como quedo demostrado, el modelo Probit es el más adecuado en comparación al modelo exponencial, el cual hace referencia a la acción independiente de las partículas virales.

HUBER Y HUGUES (1984) resumieron que el modelo exponencial es preferible cuando las pendientes de las líneas de regresión Probit no difieren apreciablemente a partir del máximo número obtenible de 2. El método aplicado en los bioensayos proporcionó líneas de regresión Probit significativas para los bioensayos individuales con pendientes alrededor de 0,8. El método es sencillo y al parecer fácilmente reproducible en otros laboratorios SPORLEDER (2003)

Nuestros resultados no presentaron mucha variabilidad en las respuestas de actividad de entomopatógenos en los diferentes tratamientos gracias a que se pudo conseguir una cobertura homogénea del patógeno además que se evitó influencia de otros factores como la humedad, gracias a que fue posible alcanzarse un rápido secado de los tubérculos tratados y al parecer sin afectar la patogenicidad de *PoGV* y *Btk*.

La metodología de bioensayos aplicado en la presente investigación es sencilla y proporcionó líneas de regresión significantes. Las pendientes generalmente se encontraron alrededor de 0,853 sin diferencias significativas entre bioensayos (tabla 3). Está previsto que los bioensayos con agentes microbianos pocas veces se alcanzan pendientes mayores a 2 (BURGES Y THOMSON 1971). Sin embargo, esta puede ser alcanzada con metodologías de bioensayo mas sofisticadas como el de alimentación por micro gotas descrito por HUGUES Y WOOD (1981). Muchos investigadores han obtenido pendientes mayores a 2 utilizando baculovirus en sus bioensayos (KLEIN Y PODOLER, 1978; EVANS, 1981). Sin embargo la replicación de resultados no es tan sencilla como lo conseguido con el método empleado en nuestros estudios. Estas metodologías más complejas no son recomendadas para la aplicación en diferentes laboratorios.

La pendiente común (0,853) encontrada en el presente estudio para el total de bioensayos, además del valor de la  $CL_{50}$  ( $1,55 \times 10^7$  gránulos por mL) son similares a los obtenidos por

SPORLEDER (2003) quien empleando el método de inmersión de huevos en suspensión de *PoGV* encontró una pendiente de 0,837 para la línea de regresión Probit y valores de  $CL_{50}$   $5,02 \times 10^6$  gránulos/mL (con límites de confianza al 95% entre  $2,59 \times 10^6 - 1,62 \times 10^7$  gránulos por mL). Esto significaría que para efectos de evaluar la actividad de *PoGV* aplicado en suspensión contra larvas neonatas de *P. operculella* no parecen haber diferencias significativas entre las forma de aplicación directa, en un caso sobre la superficie de los huevos y en la superficie de los tubérculos de papa en otra, debido a que su distribución en ambas superficies siempre será la misma, independientemente del método empleado. En consecuencia, las cantidades ingeridas por las larvas antes de ingresar al tubérculo podrían ser equivalentes, considerando que las larvas neonatas al momento de la eclosión han de ingerir los granulovirus a partir del punto de ingreso al tubérculo o en otro caso junto con el corion. La susceptibilidad disminuye con la edad, por lo que es recomendable aplicar en los estadíos tempranos de desarrollo de la plaga. (TWEETEN, 1981).

La evaluación de la actividad de *PoGV* frente a *S. tangolias* no fue llevada a cabo en razón de su no susceptibilidad al patógeno. Según lo mencionado por ANGELES (1995) la concentración utilizada para control de *P. operculella* no resulta utilizable para tener un buen control de *S. tangolias* ya que esta de todas formas ocasiona daño y que muchas veces compromete a todo el tubérculo (ANGELES, 1995).

ONORE *et al.* (2006) reportaron la identificación de un nuevo virus (no ocluido) al que denominaron Anchilibi en poblaciones de polilla de la papa, el mismo que no era posible multiplicar en laboratorio debido a que no conseguían la recuperación de larvas infectadas, porque el virus provocaba muerte rápida de las larvas en los primeros estadíos. La actividad viral  $CL_{50}$  reportada para este virus fue alrededor de 3 equivalentes larvales por litro (alrededor de  $12 \times 10^7$  gránulos por mL) contra *Tecia solanivora*, mencionando además que



este virus era capaz de multiplicarse y provocar muerte en las otras 2 especies de polilla de la papa, *S. tangolias* y *P. operculella*.

*Bacillus thuringiensis* se ha convertido en agente de control ampliamente utilizado en el mundo en vías de desarrollo, especialmente debido a que se constituye en una alternativa medioambiental al riesgo general que representan los insecticidas químicos de amplio espectro. El objetivo de este estudio ha sido evaluar si *Bt* podría ser una alternativa a *PoGV* para la protección de almacenes en la región andina contra *P. operculella* y *S. tangolias*. En el pasado, la eficacia de varias serovariedades de *Bt* han sido evaluadas para el control de *P. operculella*, reportándose susceptibilidad de numerosas serovariedades incluyendo *kurstaki*, *thuringiensis*, *tolworthi*, *galleriae*, *kenyae*, *morrisoni* y *aizava*. Entre estos *kurstaki* ha sido identificado como uno de los más virulentos contra *P. operculella* (VON ARX Y GEBHARDT, 1990; SALAMA *et al.*, 1995; SALAMA Y SALEM, 2000; HERNÁNDEZ *et al.*, 2005), esta serovariedad tiene una historia extensa de comercialización para controlar larvas de lepidópteros. La toxicidad de aislamientos de *Btk* puede ser explicado por la expresión de los genes *Cry1Ab* y *Cry1Ac* (VAN RIE *et al.*, 1994; HERNÁNDEZ *et al.*, 2005). Sin embargo, el aislamiento de *Bt* finalmente utilizado en una fórmula bioinsecticida para proteger almacenes de papa en los andes, necesita ser efectivo contra ambas especies de polilla prevalentes en la región. Este es el primer estudio que evalúa la actividad de *Btk* contra *S. tangolias*.

Los resultados de este estudio evaluando la actividad de *Btk* en suspensión pueden ser directamente comparados con los obtenidos en bioensayos utilizando el mismo producto *Btk* contra *P. operculella* y *S. tangolias*. El valor  $CL_{50}$  de DiPel 2X (aplicado a tubérculos de papa) para *P. operculella* fue alrededor de 1,5 g/litro, mientras que en *S. tangolias* la  $CL_{50}$  en el presente estudio fue aproximadamente 3 a 3,5 g/litro. Entonces *Btk* podría ser 2 veces menos eficaz contra *S. tangolias* que *P. operculella*. Cuando los coeficientes de

regresión (pendientes) de la curva de dosis-mortalidad en varias preparaciones son similares, la estimación de la potencia relativa entre ellos se hace significativa; la similar desviación de distribución de frecuencias (coeficientes de regresión) permite asumir (a menudo implica) el mismo mecanismo de respuesta. Los coeficientes de regresión de las curvas de concentración-mortalidad obtenidos para *P. operculella* y *S. tangolias* expuestas a tubérculos de papa bañados en suspensión de *Bt* fueron estadísticamente similares, es decir presentaron una pendiente de 1,393 ( $ES \pm 0.058$ ) para *P. operculella* y 1,573 ( $ES \pm 0.079$ ) en *S. tangolias*. La aplicación de fórmulas de *Bt* en talco produjo pendientes muy bajas, pero las pendientes fueron estadísticamente similares para *P. operculella* y *S. tangolias* ( $0,769 \pm 0,066$ ). La serie de bioensayos con exposición de larvas neonatas a tubérculos de papa tratados con varias concentraciones de *Bt* en talco mostraron nuevamente superior actividad del patógeno contra *P. operculella* que *S. tangolias* (4 - 8 veces). La evidente más baja susceptibilidad de *S. tangolias* debe ser considerado al ajustar la concentración de *Bt* en el producto final.

La aplicación de baculovirus con un segundo agente de control, ante la posibilidad de utilizarlo en forma combinada con bacterias y virus como ingredientes activos de insecticidas en el control de poblaciones larvarias de *P. operculella*, puede ser beneficiosa económicamente si la interacción entre ambos es sinérgico. En tales casos, aplicaciones con dosis menores de uno o ambos patógenos puede controlar exitosamente la plaga. La interacción virus-insecticida fue revisada por BENZ (1971) y la interacción virus-patógeno por KRIEG (1971).

*Bacillus thuringiensis* es una especie que se encuentra de forma natural en el suelo, produce toxinas que causan enfermedad en los insectos y los baculovirus son entomopatógenos muy específicos, considerados ideales en el manejo de plagas debido a su especificidad y su no toxicidad sobre los seres humanos o enemigos naturales de algunas plagas de cultivo.

KROSCHEL Y KOCH (1996), VON ARX Y GEBHARDT (1990), y SALAMA *et al.* (1995) mostraron que *P. operculella* es susceptible a *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* y puede ser controlado exitosamente por este patógeno. Si bien ambos patógenos (*B. thuringiensis* y *PoGV*) han sido evaluados individualmente, combinaciones de estos no fueron evaluados contra *P. operculella*. MCEWEN Y HERVEY (1959) inicialmente sugirieron a *B. thuringiensis* como un buen candidato para uso combinado con NPV (STELZER, 1965; 1967; STELZER *et al.*, 1975). Estudios realizados en poblaciones de larvas de la especie *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) tratados en primer estadio resultaron en una interacción antagonista del granulovirus respecto a la toxicidad de *B. thuringiensis* (VARGAS, 2003). Sin embargo estudios mas recientes detectaron sinergismos no discernibles entre baculovirus (NPV y GV) y *B. thuringiensis* (ENTWISTLE Y EVANS, 1985). En *Trichoplusia ni* (Noctuidae) el modo de interacción entre NPV y *B. thuringiensis* fue aditivo cuando las larvas habían sido expuestas simultáneamente a dosis bajas de ambos entomopatógenos (MCVAY *et al.*, 1976). El efecto resultó también aditivo cuando se expusieron a NPV por 24 a 90 horas previas a la exposición con *B. thuringiensis*. Sin embargo ENTWISTLE Y EVANS (1985) reportaron que los efectos aditivos ocurren en *T. ni* si las dosis son iguales o superiores al CL<sub>45</sub>, pero son antagonicos si la dosis de NPV es baja.

En esta investigación, los efectos antagonicos de la combinación de entomopatógenos se presentaron cuando *Btk* fue proporcionalmente elevada en la mezcla. Sólo cuando la concentración de *Btk* en la mezcla fue baja (menor a CL<sub>30</sub>) y *PoGV* proporcionalmente alta, pudo observarse una interacción independiente, la que se hizo más frecuente con concentraciones crecientes de *PoGV* en la mezcla. En las demás mezclas de *PoGV* y *B. thuringiensis* se produjeron mortalidades de *P. operculella* menores que las esperadas con un solo patógeno. Ambos agentes patógenos deben ser ingeridos para causar infección. *B. thuringiensis* forma células reproductoras asexuales, llamados esporas, y también produce

cuerpos cristalinos únicos durante la formación celular; ambos (esporas y cristales) actúan como toxinas sobre los insectos deseados. Los cristales de endotoxina se disuelven en el intestino de las larvas de insectos susceptibles. Ellas detienen la actividad de las células en el intestino y provocan que el insecto deje de alimentarse. Las esporas de *B. thuringiensis* pueden luego invadir otro tejidos del insecto, multiplicándose en la hemolinfa del insecto, hasta que el insecto muere. La muerte puede ocurrir dentro de unas horas a algunas semanas. Desde que los granulovirus y *B. thuringiensis* son aplicados juntos sobre la superficie de la papa, ninguna interferencia podría ocurrir por el reducido consumo de alimento después de la ingestión de *B. thuringiensis* (en contraste a los casos donde los virus han sido mezclados a dietas). Desde que ambos patógenos encuentran una interferencia tóxica en el estómago puede ocurrir alteración de la pared intestinal. Además ambos patógenos actúan distintamente sobre el sistema endocrino del insecto, lo que podría influir en el modo de interacción entre los dos patógenos en infecciones mixtas. Por ejemplo, los baculovirus regulan la apoptosis (inhibición e inducción) y, al mismo tiempo, la replicación del baculovirus y la patogénesis son sensibles a la apoptosis (CLARKE Y CLEM, 2003; CLEM, 2005). Coinfecciones con *Bt* y endotoxinas podrían afectar este sistema y de ese modo reducir la virulencia de baculovirus. Sin embargo, aun cuando los principios de la interacción no pueden ser explicados, aplicaciones simultáneas de *PoGV* y *B. thuringiensis* en niveles de concentración elevado no resultan probablemente económicos. Los efectos beneficiosos podrían ocurrir cuando los agentes patógenos son usados en combinaciones de baja concentración y en intervalos para la supresión de la población parcial. En tal caso la proporción de *Btk* debería ser más baja que la de *PoGV*.

Difícilmente un ingrediente pesticida activo en forma relativamente puro, listo para su uso por el fabricante, será apropiado para aplicación en el campo (WHITFORD, 2006). Un ingrediente activo usualmente debe ser formulado de manera que mejore la efectividad del

pesticida en el campo; mejore sus características de seguridad y sea manejable. Lo siguiente ya pasa por la elección de una fórmula, como decisión importante de la administración del producto, que tendrá impacto en la rentabilidad, la seguridad humana y la calidad ambiental; manteniéndose en contacto con la plaga después de la aplicación y habilitándolo para cumplir su función en el mercado (WHITFORD, 2006). Es importante considerar y evaluar varias formas de un mismo pesticida para cumplir con las diferentes necesidades de control de plagas, siendo preciso encontrar de una gama de posibilidades una fórmula ideal que nos ayude a mejorar la utilidad del producto. Las fórmulas en polvo pueden proveer una cobertura excelente. La primera línea de resistencia a la plaga cuando las fórmulas son aplicadas es el material inerte que recubre a los tubérculos, luego la planta hospedera.

Muchos agricultores productores de papa, como medida de protección de sus tubérculos almacenados contra las plagas, realizan aplicaciones por espolvoreo de materiales como caolín y cal, producidos de manera artesanal y comercializados a nivel local. Estos materiales sin llegar a ser formulados con patógenos les han servido para controlar plagas como la polilla de papa en sus almacenes, seguramente con diferente grado de éxito. Entonces no resulta difícil comprender la actividad que poseen.

Los polvillos son fabricados por medio de la adsorción de un ingrediente activo en un material inerte finamente molido tal como el talco, la arcilla, o la tiza. Éstos son relativamente fáciles de utilizar ya que no necesitan ser mezclados con agua, y el equipo de aplicación (por ejemplo el fuelle de mano y el pulverizador de bulbo o al interior de bolsas de aplicación) es liviano y simple. Los polvillos pueden proveer una cobertura excelente, pero así como el tamaño de las partículas pequeñas presentan una ventaja, también crean un peligro de inhalación y de ser arrastrados por el aire (WHITFORD, 2006). Este riesgo ha sido suficientemente minimizado mediante la aplicación al interior de bolsas de plástico.

La serie de bioensayos con exposición de larvas neonatas de *P. operculella* y *S. tangolias* a tubérculos tratados con talco a diferentes dosis de aplicación, mostraron elevada susceptibilidad de *S. tangolias*. La actividad abrasiva del talco puede ser la razón por el cual el producto tradicional conocido como fórmula de *PoGV* en talco protege en grado eficaz los almacenes de papa contra *S. tangolias* (WINTERS Y FANO, 1997). A partir de estos resultados, era de esperarse que la aplicación de 5 g por kg de papa, el mismo que ha sido recomendado para el producto formulado de *PoGV* en talco, elimine alrededor 36% - 47% de larvas de *P. operculella* y alrededor del 66% de *S. tangolias*. Sin embargo, en resultados obtenidos mediante exposición de larvas de ambas especies a una fórmula de *Btk* en talco, aplicado con dosis similares, la mortalidad en *S. tangolias* fue altamente variable. Las larvas de polilla de la papa generalmente penetran los tubérculos de papa a través de las yemas. Una explicación podría ser que el producto no fue cuidadosamente aplicado sobre los tubérculos en el bioensayo 3, resultando de ello una baja mortalidad debido al talco, aun cuando haya sido buena debido al patógeno. Esto indicaría que la eficacia de los tubérculos tratados depende de la calidad de aplicación del producto, es decir, cobertura total de los tubérculos, en especial las yemas. Para asegurar una apropiada aplicación del producto ayudaría recomendar mayores dosis de aplicación del producto en el futuro (entre 6 - 7 g por kg).

Los bioensayos con exposición de larvas neonatas de *P. operculella* y *S. tangolias* a tubérculos tratados con caolín en diferentes dosis de aplicación mostraron efectividad solo frente a *S. tangolias*; la cal por su parte una actividad moderada. La actividad abrasiva de estos materiales, no parece afectar considerablemente a *P. operculella*, ya que ni siquiera con la máxima dosis aplicable (15 g por kg) se pudieron controlar el 50% de larvas (figura 12). Comparativamente la actividad del caolín y la cal son menores a la ejercida por el talco, quizá debido al grosor de sus partículas, siendo fina en el talco y algo más gruesa en

estos otros materiales; esta característica permite al momento de ser aplicados sobre los tubérculos, ciertas diferencias de cobertura superficial que suelen ser más homogéneas en la aplicación con talco.

La pendiente común (1,234) de las líneas de regresión entre mortalidad Probit y dosis de aplicación de caolín de *P. operculella* y *S. tangolias* fue casi similar a la pendiente común de regresión Probit de los bioensayos con aplicación de talco (1,195). Las diferencias de actividad de control del caolín respecto al talco contra *P. operculella* mostrados a partir de sus valores  $CL_{50}$  y líneas de regresión, fueron aproximadamente entre 8,05 y 13,7 veces menores. En el caso de *S. tangolias* esta diferencia demostró 5,2 veces menor efectividad de control respecto al talco. Los mayores márgenes de diferencia de actividad en *P. operculella* explican la menor efectividad del caolín en comparación al talco, así mismo la menor diferencia explica también la moderada efectividad contra *S. tangolias*. Se puede decir entonces, tomando como referencia el comportamiento de ambas especies frente al talco, que la actividad del caolín es baja contra larvas de *P. operculella* y moderada contra las de *S. tangolias*.

La pendiente común (1,222) de las líneas de regresión entre mortalidad Probit y dosis de aplicación de cal contra *P. operculella* y *S. tangolias* es similar a la pendiente común de regresión de los bioensayos con aplicación de talco (1,195). La diferencia de actividad de la cal contra *P. operculella* respecto a los valores  $CL_{50}$  y las líneas de regresión de los 2 bioensayos con talco, mostraron entre 6,36 y 10,9 veces menor efectividad. Estos márgenes de diferencia en *P. operculella* explican la menor efectividad de la cal. En el caso de *S. tangolias* esta diferencia de actividad fue 4,4 veces menor, explicándose también por esta diferencia la moderada efectividad de la cal contra esta especie. No resulta recomendable por lo tanto su uso como material inerte de fórmulas, en razón de que su actividad de control dependería más de la concentración de patógeno, teniendo que ser necesariamente

mayor si se pretendiera elaborar un producto con actividad equivalente a una fórmula en talco. Esta misma observación es aplicable al caolín.

El polvo de arena fina provoca los más bajos niveles de actividad de control comparado con aplicaciones similares de materiales inertes como el talco, caolín y cal sobre larvas de ambas especies de polilla de la papa. Además, entre la menor y mayor dosis de aplicación (6,25 - 15 g por kg) presentó estrechos rangos de actividad de control. Los índices de mortalidad observadas: de 7 a 12% en *P. operculella* (5% de incremento) y 9 a 15% ante *S. tangolias* (6% de incremento), demuestran la baja actividad de este material inerte y ningún incremento significativo en las respuestas de mortalidad como consecuencia del incremento de dosis de aplicación frente a ambas especies; haciendo del polvo de arena un material con desventaja en el control de poblaciones de polilla en almacenes de papa, por no ejercer mayor efecto propio. Sin embargo, las bondades de este material inerte no son nada despreciables cuando son aplicados en fórmula junto a patógenos como *PoGV* y *Btk* contra larvas de *P. operculella* y *S. tangolias*, debido a que permiten alcanzar niveles importantes de mortalidad, siendo entonces una alternativa a la forma convencional de fórmula en talco.

La pendiente común (1,222) de las líneas de regresión entre mortalidad Probit y dosis de aplicación del polvo de arena contra *P. operculella* y *S. tangolias*, fue también similar como en el caso del caolín y la cal a la pendiente común de regresión Probit de los bioensayos con aplicación de talco (1,195). La diferencia de actividad del polvo de arena contra *P. operculella* respecto a los valores  $CL_{50}$  y las líneas de regresión Probit de los 2 bioensayos con talco, mostraron en teoría entre  $9,86 \times 10^4$  y  $1,68 \times 10^5$  veces menor susceptibilidad para esta especie, considerando que sus límites de confianza son demasiado amplias. Los mayores márgenes de diferencia en *P. operculella* explica también la poca efectividad de la arena comparada con la mostrada frente al talco. En el caso de *S. tangolias* esta diferencia



representó  $1,17 \times 10^5$  veces menor susceptibilidad respecto al talco, explicándose también por esta gran diferencia la baja efectividad del polvo de arena contra esta especie.

El polvo de arena es un recurso que puede encontrarse en la naturaleza en forma de depósitos de polvo como efecto del transporte de partículas por acción del viento, también como partículas generadas entre otros a partir de procesos de obtención de “piedra chancada” en la industria de preparación de materiales de construcción. Esta última fuente en si sería la más recomendable, debido a que para fines de ser utilizado como vehículos de patógenos, posee mayor proporción en partículas menores a  $50 \mu\text{m}$ , que fueron separadas mediante un tamizado del material “bruto” obtenido de los depósitos de polvo de arena.

Respecto a las comparaciones del efecto de los materiales inertes, sobre la mortalidad de larvas, aplicados a una misma dosis (5 g de material inerte por kg de papa); los resultados nos permitieron establecer diferencias significativas (tabla 10) entre ambas especies (figura 15). Las diferencias más notables fueron observadas entre el talco y el polvo de arena. Ambos materiales en términos de grosor de partículas y densidad tienen características bastante diferentes; el talco es de menor grosor y densidad, confiriéndole mejores ventajas de cobertura y homogeneidad al ser aplicados sobre tubérculos de papa. Los otros materiales como caolín y cal, sin tomar muy en cuenta su composición química, presentan ligeras diferencias en el tamaño de partículas respecto al talco, brindando coberturas no muy similares a las proporcionadas por este material. Por lo tanto, la aplicación con dosis equivalentes no significa igual cobertura de los materiales empleados. Estas diferencias de cobertura son más notorias en las aplicaciones con polvo de arena por presentar más espacios libres que podrían ser punto de ingreso de las larvas a los tubérculos. El conjunto de materiales evaluados pueden agruparse entonces en 3 grupos: de baja actividad como el caso del polvo de arena, de actividad intermedia la cal y caolin, con alta actividad el talco.

La mayoría de los plaguicidas además de los compuestos activos, comprenden vehículos, así como solventes y productos destinados a mejorar la actividad del producto. Estos ingredientes a veces tienen un efecto importante en la fórmula, como es el caso de los materiales empleados en el presente estudio. Es un error entonces considerarlos como inertes en general (en todo caso deebn ser inertes a los compuestos activos de la fórmula). Una exigencia en el uso de plaguicidas según el CONAMA (1988) es la disminución de riesgos por emisión de material particulado durante la aplicación; los materiales en estudio reúnen las características necesarias para cumplir con esta exigencia, sobre todo cuando la aplicación se hace en el interior de bolsas de plástico según la técnica propuesta por el CIP para la protección de tubérculos en almacén.

La posibilidad ideal de tratamiento de tubérculos de papa en sistemas de almacenamiento con entomopatógenos en suspensión acuosa como es de comprenderse no resulta aplicable, por las implicancias negativas que se darían cuando los tubérculos se verían afectados por hongos y/o bacterias que encontrarían bajo esas circunstancias condiciones ambientales favorables de humedad para su desarrollo, desencadenando la pérdida de los tubérculos. Además que se desaprovecha la capacidad de control que tienen los materiales inertes. Aún si se contemplara la viabilidad de someter los tubérculos tratados a procesos de secado rápido podría ser perjudicial sobre la potencialidad de los mismos patógenos y aumentaría los costos técnicos. Sin embargo, la aplicación de *PoGV* y *Btk* en suspensión en los bioensayos nos ha permitido conocer la actividad de estos en condiciones óptimas de distribución superficial en los tubérculos y sirvió para estimar las concentraciones apropiadas en las fórmulas en polvo seco, optimizando además los cálculos según los niveles de control que se esperan alcanzar para fines más prácticos.

Las fórmulas de patógenos en polvo seco además de adecuarse a las formas de aplicación, y proporcionar estabilidad al principio patógeno activo, según (ALVES, 2003) pueden

aumentar o inhibir la alimentación de la plaga y provocar mayor o menor mortalidad en menor o mayor tiempo. El mismo investigador menciona que no es usual encontrar trabajos que evalúan el efecto de la humedad en fórmulas de baculovirus y que de manera general, la estabilidad de las preparaciones virales aumenta a medida que disminuye la humedad del producto. En tanto reportó de que el virus de la granulosis de *Pieris rapae* ha sido más estable cuando fue almacenado húmedo (ALVES, 2003).

Las fórmulas empleadas tuvieron las ventajas convencionalmente recomendadas de estar preparadas listas para uso directo, con bajo porcentaje de ingredientes activos, y poseer material inerte seco muy fino (GLADSTONE Y HRUSKA, 2003). El tamaño de las partículas es importante para garantizar la ingestión de las toxinas o esporas asociadas a los materiales inertes, aunque el mecanismo de ingreso del patógeno hacia el huésped no necesariamente sería exclusivamente debido a su ingestión junto con las partículas de material inerte adheridas al tubérculo. También podría darse que durante la aplicación de las fórmulas a los tubérculos, una proporción de los patógenos se vaya distribuyendo directamente en la superficie del tubérculo quedando expuestos a la ingestión por parte de las larvas. Estos mecanismos pueden ser mejor comprendidos cuando se hacen comparaciones entre los bioensayos con fórmulas de *PoGV* y *Btk* en arena y talco que proporcionan diferentes grados de cobertura pero buenas respuestas de actividad de control biológico (tabla 11; tabla 12; tabla 13). Entonces el efecto de las fórmulas sobre las larvas de ambas especies será la suma de actividades del patógeno presente en la fórmula y la del material inerte.

Los altos niveles de respuestas de mortalidad alcanzada (cercano al 100%), no necesariamente indicaron ausencia de daños en los tubérculos; estos siempre estuvieron presentes en grado variable, sobre todo en las fórmulas con *PoGV* a diferencia de los que contenían *Btk* que muestran daños menores. Significa entonces que, *PoGV* es efectivo para controlar *P. operculella* pero son lentos en actuar. Esta es una característica que ha sido

puntualizada de manera general por GLADSTONE Y HRUSKA (2003) para los agentes entomopatógenos de origen microbiano. Sin embargo, también mencionaron que los agentes microbianos con más rápida acción tales como *Bt* y varios virus, tienen la capacidad de detener la alimentación del insecto y por tanto, su daño, en un día o dos; desafortunadamente *PoGV* no es uno de ellos.

De los componentes del producto *PoGV* formulado en talco que se ha venido usando convencionalmente, *PoGV* cumple con controlar las poblaciones de *P. operculella* interrumpiendo su ciclo vital, en razón del hallazgo de larvas enfermas, mientras que el otro componente, el talco, además de controlar por algún mecanismo directo a *P. operculella*, es también importante porque hace posible la presencia de menores daños en los tubérculos almacenados. Esto pudo ser claramente observado por la mayor cantidad de larvas enfermas con el signo característico de la granulosis (larvas blanquecinas con desplazamiento lento) encontradas en los bioensayos con aplicación de *PoGV* en suspensión acuosa respecto a aplicaciones con fórmula en talco. Tomando como referencia de ambos casos los tratamientos con mayor concentración de *PoGV* ( $1,2 \times 10^9$  gránulos por mL), las respuestas de mortalidad (se consideran las larvas enfermas encontradas en estadios avanzados de desarrollo que inevitablemente murieron al no poder empupar y las que no se encontraron como enfermas por haber muerto en estadios tempranos de desarrollo) fueron cercanas al 96%, sin embargo la proporción de larvas enfermas (se consideran solo las larvas enfermas encontradas en estadios avanzados de desarrollo) fueron 66% (8 veces mayor) en el bioensayo con aplicación de *PoGV* en suspensión acuosa y 8% en el bioensayo con aplicación de fórmula en talco. Esa diferencia en larvas enfermas encontradas (58%) sería por lo tanto, la diferencia de daño evitado por el talco en los tubérculos almacenados y la contribución de este material inerte como componente importante de la fórmula sobre la mortalidad de larvas de *P. operculella*.

La diferencia en el daño observado en los tubérculos se da por el hecho de que aún cuando la larva esté infectada, mientras esté viva y desarrollándose, continua alimentándose del tubérculo y provocando daño. Este daño estará siempre presente mientras se vea presencia de larvas enfermas. Aplicaciones con concentraciones equivalentes de *PoGV* en suspensión acuosa y fórmula en talco no evitan niveles equivalentes de daño en los tubérculos almacenados, sino más bien perjuicio menor en las aplicaciones con fórmula en talco; aun cuando los niveles de control en la población de polillas sea el mismo.

Disminuir la dosis tradicional de aplicación (5 g por kg) a una dosis de 1,25 g por kg empleando la fórmula con mayor concentración de *PoGV* ( $1,2 \times 10^9$  gránulos por g) disminuyó las respuestas de mortalidad desde el 96% al 50% con un incremento en el número encontrado de larvas enfermas de 8% a 27%. Aplicaciones en menor dosis (0,625 g por kg) de la misma fórmula disminuyeron aún más las respuestas de mortalidad, hasta niveles del 40%; pero esta vez con la diferencia de que en lugar de aumentar el índice de larvas enfermas, como sucedió con la dosis de 1,25 g por kg, disminuyó al 14%, debido a la menor cantidad de *PoGV* en la superficie del tubérculo. Estos índices sugieren que es inconveniente disminuir la dosis tradicional de aplicación, resaltando la importancia del talco en la reducción de perjuicios provocados por la polilla de la papa en los tubérculos almacenados.

La aplicación de fórmulas de *Btk* en talco produjeron pendientes muy bajas, pero fueron estadísticamente similares para *P. operculella* y *S. tangolias* ( $0,769 \pm 0,066$ ). La serie de bioensayos con exposición de larvas neonatas a tubérculos de papa tratados con varias concentraciones de *Btk* en talco, comparado a las aplicaciones en suspensión sobre tubérculos de papa que mostraron superior actividad del patógeno contra *P. operculella* respecto a *S. tangolias* (2 veces), fueron nuevamente mayores (4 – 8 veces) y con mayor diferencia. El aumento en la diferencia de susceptibilidades entre estas dos especies estaría

explicado por la mayor susceptibilidad de *S. tangolias* al talco. La evidente menor susceptibilidad de *S. tangolias* debe ser considerada al ajustar la concentración de *Btk* en el producto final.

La aplicación de fórmulas de *Btk* en arena a diferencia de las de talco no produjeron pendientes bajas, además fueron estadísticamente similares para *P. operculella* y *S. tangolias* ( $1,298 \pm 0,075$ ). Los bioensayos con exposición de larvas neonatas a tubérculos de papa tratados con varias concentraciones de *Btk* en arena al igual que con las aplicaciones en suspensión sobre tubérculos de papa mostraron, nuevamente, superior actividad del patógeno contra *P. operculella* respecto a *S. tangolias* y la misma diferencia de susceptibilidades (2 veces). Esta menor susceptibilidad de *S. tangolias* debe ser considerada al ajustar la concentración de *Btk* si se elige la arena como material inerte del producto final.

Si tomamos como referencia las aplicaciones de *Btk* en suspensión acuosa; las fórmulas de *Btk* en arena y talco gracias a la actividad biológica propia de los materiales inertes mejoran la susceptibilidad de *P. operculella* y *S. tangolias*, contribuyendo en disminuir la concentración de *Btk* necesaria para alcanzar los valores  $CL_{50}$ . Los niveles de reducción de *Btk* necesario para alcanzar la  $CL_{50}$  con la fórmula en arena son del orden del 25% para *P. operculella* y 35% en *S. tangolias*. Las fórmulas en talco mostraron a su vez niveles de reducción más altos; estos fueron alrededor del 80 a 85% para *P. operculella* y 40 a 70% en *S. tangolias*. Estos índices demuestran otro punto importante a favor de la conveniencia de utilizar fórmulas en polvo para el control de este tipo de plaga en almacenes de papa que se puede traducir en reducción de costos al realizar un control biológico planificado.

Las fórmulas en talco a comparación de las de arena mostraron alrededor de 25% menor concentración de *Btk* necesaria para alcanzar los valores  $CL_{50}$  en *P. operculella* y entre 40%

a 90% frente a *S. tangolias*. El uso del polvo de arena como material inerte de fórmulas sobre todo de *Btk* para controlar poblaciones de polilla de la papa en almacenes resulta una buena alternativa al uso de fórmulas convencionales en talco. Teniendo que hacerse solo algunos ajustes en función a la especie de polilla predominante en la zona de aplicación, a la rentabilidad del producto, a los niveles esperados de control de la población de polilla y al grado de disminución de daños en los tubérculos almacenados. La mayor cantidad de patógeno necesaria en una fórmula en arena puede ser compensada con el menor costo de este material inerte respecto al talco.

La extrapolación de datos de bioensayo al rendimiento en campo es siempre difícil debido a que algunos factores bióticos y abióticos tienen que ser tomados en cuenta. EVANNS (1994). En los experimentos la fórmula en talco contenía 15 g de DiPel 2X por kilogramo aplicado a una dosis de 5 gramos por kilogramo de papa. Acorde a lo resultados previos de laboratorio se esperó que tales aplicaciones causaran aproximadamente una mortalidad de 95% en *P. operculella* y 75% en *S. tangolias*, debido a la fórmula de *Btk*. Agregando el efecto teórico del talco de la fórmula sobre la mortalidad, excedería el 90% en *S. tangolias*. Los experimentos mostraron que tales aplicaciones disminuyeron suficientemente los niveles de infestación inicial y protegieron los tubérculos por un periodo cercano a los 100 días de almacenamiento. La disminución de la capacidad de protección mas allá de los 100 días puede ser atribuido a la germinación de los tubérculos de papa, y a su proceso de deshidratación que posibilita su arrugamiento y desprendimiento de parte de la fórmula de cobertura; estos cambios facilitan el ingreso de larvas a través de las superficies no protegidas. Debido a la germinación y deshidratación cualquier fórmula perdería eficacia contra la infestación del tubérculo después de largos periodos de almacenamiento. Por consiguiente, la limpieza del almacén para prevenir la reinfestación a partir de restos de tubérculos almacenados en otras campañas de cosecha es un aspecto

complementario importante para un buen manejo de la polilla de la papa. Los resultados mostraron también que los niveles iniciales de infestación influyen suficientemente para que la infestación del tubérculo aumente en el tiempo; por lo que es esperable que la infestación crezca exponencialmente.

Cuando los agricultores toman en consideración la limpieza del almacén, se puede esperar que la fórmula de *Btk* brinde un adecuado control de *S. tangolias* y *P. operculella*. Los aspectos económicos del producto deben ser evaluados en el futuro. El precio de mercado de 1 kg de DiPel 2X es alrededor de US\$ 100,00. Por consiguiente, 15 g de *Btk* por kg de talco agregaría US\$ 1,5 por cada kilogramo al costo del producto (esta fórmula puede proteger 200 kg de papa almacenada) mientras que ya no sería necesario *PoGV* en el producto (*PoGV* no ha tenido efecto en estos experimentos debido a que *S. tangolias* ha sido la plaga predominante). Debido a la baja pendiente de la curva de concentración/mortalidad, y haciendo un mayor ajuste de la concentración de *Btk* en la fórmula, por razones económicas, es posible sugerir una disminución de la cantidad de *Btk*; por ejemplo, disminuyendo la concentración de *Btk* a la mitad en la fórmula en talco, y según las curvas de concentración mortalidad obtenidas en los experimentos, la mortalidad de larvas de *S. tangolias* disminuiría teóricamente desde 75 a 67%.



## VI CONCLUSIONES

- Dos fórmulas: *Btk* en talco (15 g de DiPel 2X por kg) y *Btk+PoGV* en talco ( $1 \times 10^8$  gránulos + 15 g de DiPel 2X por kg) fueron desarrollados y aplicados en almacenes de papa, los mismos que solo permitieron incrementos poblacionales exponenciales de *S. tangolias* después de los 90 días (*P. operculella* se mantuvo en poblaciones muy bajas), con índices de crecimiento diario de 2,7% y 3,0 % (pupas y larvas/100 tubérculos) respectivamente (los niveles iniciales de infestación disminuyeron a los 30 días). Los niveles finales de infestación (170 días después de la aplicación), en los tubérculos almacenados, frente a ambas fórmulas fueron significativamente menores (4 – 5 veces) respecto a los controles.
- La interacción entre *PoGV* y *Btk* frente a *P. operculella* fue mixta, pero con tendencia al antagonismo; los efectos sinérgicos fueron solamente discernibles cuando las larvas estuvieron expuestas a bajas concentraciones de ambos patógenos, debido a esto, no resulta conveniente para su control la utilización de fórmulas combinadas de *PoGV* y *Btk*, ni beneficioso económicamente incrementar sus concentraciones.
- La  $CL_{50}$  de *PoGV* aplicado a tubérculos de papa por inmersión en suspensión acuosa, sobre larvas de *P. operculella* fue de  $1,65 \times 10^7$  ( $IC_{95\%}$ :  $1,26 \times 10^7$  -  $2,14 \times 10^7$ ) gránulos por mL. Las  $CL_{50}$  del producto DiPel 2X (*Bt* var *Kurstaki*), aplicado del mismo modo, sobre larvas de *P. operculella* y *S. tangolias* fueron de 1321 ( $IC_{95\%}$ : 1084 - 1555) mg por litro ( $4,23 \times 10^7$  UI de potencia por litro); y 3095 ( $IC_{95\%}$ : 1711 - 3575) mg por litro ( $9,90 \times 10^7$  UI de potencia por litro) respectivamente.
- El talco brinda mejor protección a los tubérculos almacenados, alcanzando con la máxima dosis aplicable (15 g por kg de papa) respuestas de mortalidad hasta de 65% en *P. operculella* y 90% en *S. tangolias*. El caolín y la cal poseen baja actividad contra *P. operculella*; y moderada contra *S. tangolias*, mientras que la arena una baja actividad frente a ambas especies. Observándose además mayor susceptibilidad en *S. tangolias* respecto a *P. operculella* frente a todos los materiales.
- Las fórmulas de ambos patógenos en talco mejoraron la eficacia de control respecto a las aplicaciones acuosas; alcanzando los mismos niveles de respuesta  $CL_{50}$ , con concentraciones menores de *PoGV* (16 veces frente a *P. operculella*) y *Btk* (5 – 6 veces contra *P. operculella* y 2 - 4 veces sobre *S. tangolias*).

## VII RECOMENDACIONES

- Fomentar la utilización de un producto a base de *Btk* o *PoGV* en talco dependiendo de la especie predominante en la zona de producción de papa; efectuando ajustes en la concentración de *Btk* o aumentando la dosis de aplicación material inerte (> 5 g por kilogramo de papa) para mejorar su efectividad, especialmente contra *S. tangolias* por su menor susceptibilidad frente a este patógeno en comparación a *P. operculella*.
- No resulta recomendable la utilización de fórmulas combinadas de *PoGV* y *Btk* para controlar poblaciones de polilla de la papa, debido a que, mientras solo se consigue efectos sinérgicos de control sobre *P. operculella* cuando las concentraciones de ambos patógenos es baja (no es económicamente beneficioso incrementar las concentraciones de los patógenos en combinaciones mixtas), para *S. tangolias* es suficiente una fórmula individual de *Btk*.

## VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT WS. (1925) A method for computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economical Entomology 18, 265-267.

ADAMS JR; MCCLINTOCK TJ. (1991) Baculoviridae: nuclear polyhedrosis virus. En: ADAMS, J.R.; BONANI, J.R. (Eds.). Atlas of invertebrate viruses. Boca Raton: CRC, 1991. p. 87-204.

AGRICULTURA (2003) Información Fitosanitaria, *Phthorimaea operculella*. Polilla de la papa. Gobierno de Canarias. Epub. <http://www.gobcan.es/agricultura/agricultura/infofito/default.htm> 20/6/03.

AGROANCASH, (2008) La papa o patata. Año internacional de la papa. Importancia Económica Mundial. [http://www.agroancash.gob.pe/public/articulos/aip2008/temas/importancia\\_eco\\_geo.htm](http://www.agroancash.gob.pe/public/articulos/aip2008/temas/importancia_eco_geo.htm) epub /11/11/2008

AGROICA (2005) Información de cultivos en el valle de Ica. Cultivo de Papa. Portal Agrario Regional Ica. Epub <http://www.agroica.gob.pe/papas.shtml>. 14/09/2005.

AKAIKE H. (1973) Information theory as an extension of the maximum likelihood principle. En: Second International Symposium on Information Theory (eds B.N. Petrov Y F. Csaki), pp. 267–281, Akademiai Kiado, Budapest.

ALCÁZAR J. (2000) Componentes de manejo del Gorgojo de los Andes en Perú. Curso Internacional de MIP en papa. CIP. Módulo II.

ALCÁZAR J; PALACIOS M Y RAMAN K. (1982) *Symmetrischema plaesionema* (Turner, 1919). Nuevo problema de la papa en el Valle del Mantaro. Convención Nacional de Entomología. Resúmenes. Huaraz, Perú.

ALCÁZAR J, CERVANTES M Y RAMAN K. (1991) Un virus como agente de control de la polilla de la papa *Phthorimaea operculella*. Rev. Per. Ent. 34:101-104.

ALCÁZAR J. Y RAMAN KV. (1992) Control de *Phthorimaea operculella* en almacenes rústicos, empleando virus granulosis en polvo. Revista Peruana de Entomología 35, 117-120.

ANGELES I, Y ALCÁZAR J. (1995) Susceptibilidad de la polilla *Scrobipalpuloides absoluta* al virus de la granulosis de *Phthorimaea operculella* (PoGV). Rev. Per. Entomol. 38: 65-70.

ANGELES I, Y ALCÁZAR J. (1995) Susceptibilidad de la polilla *Phthorimaea operculella* al virus PoGV. Rev. Per. Entomol. 38: 71-76.

ANGELES I. (1996) Susceptibilidad de *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick) y *Symmetrischema tangolias* (Gyen) al virus de la granulosis de *Phthorimaea operculella* (Zeller). Tesis para optar el Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima – Perú.

ALVES L. (2003) Formulação de entomopatógenos. Biotecnologia Ciência y Desenvolvimento. pp 32-34.

BENZ G. (1971) Synergism of microorganisms and chemical insecticides. En: Advances in Crop Research (ed.: J. Kroschel), Margraf Verlag, Germany. Vol 3. 112-113pp,.

BERGOLD GH. (1963) The molecular structure of some insect virus inclusion bodies. J. Ultrastruct. Res. 8:360-378. En: TWEETEN KA., BULLA LA JR, Y CONSIGLI RA. (1981) Applied and Molecular Aspects of Insect Granulosis Viruses. Microbiological Reviews, Vol. 45, No. 3. sept. 1981, p. 379-408.

BILIMORIA SL. (1986) Taxonomy and identification of baculoviruses. En: GRANADOS RR; FEDERICI BA. (Eds.). The biology of baculoviruses. Boca Raton: CRC, 1986. v.1, p.37-59.

BILIMORIA SL. (1991) The biology of nuclear polyhedrosis viruses. En: KURSTAK, E. (Ed.). Viruses of invertebrates. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 1-72.

BLISSARD GW. (1996) Baculovirus-insect cell interactions. Cytotechnology 20:70-93. En WESTENBERG, M. (2004) Functional analysis of a nobel baculovirus envelope fusion protein. Thesis Wageningen University. 120 p.

BRIESE T, Y MENDE A. (1981) Differences in susceptibility to a granulosis virus between field populations of the potato moth *Phthorimaea operculella* (Zeller). Bull Entomol Res 71, 11-18.

BROODRYK SW, Y PRETORIUS LM. (1974) Occurrence in South Africa of a granulosus virus attacking tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Phytophylactica*, 3, 73-84.

BURGES HD, Y THOMPSON EM. (1971) Standardization and assay of microbial insecticides. In: *Microbial Control of Insect and Mites* (eds.: BURGES HD, Y HUSSEY NW.) 591-622pp, Academic Press, London and New York.

CATIE (2002) Curso Producción y Uso de Agentes Microbianos para el Control de Plagas en Agricultura Ecológica. Costa Rica.

CHURA J. (1992) Ciclo biológico de la polilla de papa *Phthorimaea operculella*. (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae), en laboratorio. Tesina. Tec. Agr. Universidad Mayor de San Simón. Escuela Técnica Superior de Agronomía “Jorge Trigo Andia”. Cochabamba, Bol. 56p.

CIP, (1988) Manejo integrado de plagas de la papa en países del tercer mundo. Circular del Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima. 16(1): 1-12.

CIP, (1983) Control de la palomilla de la papa con feromona. Circular del Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima.

CIP (1992) Control Biológico de la polilla de la papa con Baculovirus *Phthorimaea*. Boletín de capacitación CIP 2, del Centro Internacional de la Papa 2; 26 pp. Lima.

CIP, (1996) Principales Enfermedades, Nematodos a Insectos de la Papa, Boletín del Centro Internacional de la Papa. Lima. 43p.

CISNEROS F. (1980) Principios de control de las plagas agrícolas. Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima. 189p.

CLEM RJ. (2005) The role of apoptosis in defense against baculovirus infection in insects. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 289, 113-129.

CLARKE TE, Y CLEM RJ. (2003) Insect defenses against virus infection: The role of apoptosis. *International Reviews of Immunology* 22, 401-424.

CONAMA, (1998) Guía para el control y prevención de la Contaminación Industrial. Fabricación de plaguicidas, Insecticidas, pesticidas y fungicidas. Publicado por Comisión Nacional del Medio Ambiente – Región Metropolitana. pp77. Santiago.

CRANSHAW WS. (1999) *Bacillus thuringiensis*. Colorado State University Cooperative Extension – Horticulture. No 5.556. Epub. <http://www.ext.colostate.edu/pubs/insect/05556.html> 04/02/2005.

CROOK, (1991) Baculoviridae: sub-group B Comparative aspects of granulosis viruses. En: KURSTAK E. (Ed.). Viruses of invertebrates. New York: Marcel Dekker, 1991. p.73-110.

DAS GP, LAGNAOUI A, SALAH HB, SOUIBGUI M. (1998) The control of the potato tuber moth in storage in Tunisia. Tropical Science 38: 78-80.

DÍAZ MC, SOBRERO C, PICA Y. (2004) Aseguramiento y Control de Calidad de Bioensayos. International Development Research Centre IDRC. Epub. [http://www.idrc.ca/en/ev-8574-201-1-DO\\_TOPIC.html](http://www.idrc.ca/en/ev-8574-201-1-DO_TOPIC.html). /4/10/2004

DEACOM, J. (2005) The Microbial World: *Bacillus thuringiensis*. Institute of Cell and Molecular Biology. The University of Edinburgh. Epub. <http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/control.htm> /17/03/2005

ENGELHARD EK, KAM-MORGAN; L.N.W., WASHBUM JO., VOLKMAN LE. (1994) The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1, 3224 1327.

ENTWISTLE PF, Y EVANS HF. (1985) Viral control. En: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (eds KERKUT I, Y GILBERT LI.), Vol. 12. pp. Pergamon, Oxford.

ESPINOZA A. (1994) Utilización de baculovirus para el control de la palomilla dorso de diamante, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras. 97 p.

EVANS HF. (1994) Laboratory and field results with viruses for the control of insects. In: BCPC Monograph N° 59: Glasshouse and Field Pesticide Performance II (eds.: H.G. HEWITT, J. CASELEY, L.G. COPPING, B.T. GRAYSON Y D. TYSON). British Crop Protection Council, Farnham Royal, Slough, England. 285-296pp,

EVANS HF, Y SHAPIRO M. (1987) Viruses. In Manual of Techniques in Insect Pathology (ed.: A.L. Lacey), Academic Press, Inc., San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokio, Toronto. 17-53pp.

EVANS HF. (1981) Quantitative assesement of the relationship between dosage and response of the nuclear polyhedrosis virus of *Mamestra brassicae*. J. Invertebr. Pathol., 37, 101 – 109.

FAOSTAT (2006) epub. <http://faostat.fao.org/faostat/> 27/10/2008.

FERNANDEZ O, Y VEGA L. (2002) Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*. Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos, CATIE-GTZ. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica) No. 64 p. 110 - 115.

FINNEY, JR. (1971) Probit analysis, 3rd ed. Cambridge University Press.

FONTAGRO, (2006) Desarrollo y aplicación de prácticas ecológicas en el manejo de plagas para incrementar la producción sostenible de papas de los agricultores de bajos recursos en las regiones andinas de Bolivia, Ecuador y Perú. Información Básica de la propuesta. 30p.

FUENMAYOR M, SAYAGO M. (2007) Plaguicidas microbianos: Una alternativa del control biológico. FONAIAP. Centro de Investigaciones Agropecuarias del estado Tachira, Bramón. Agricultura 4, 25p.

FUNDERBURK J, MARUNIAK J, BOUCIAS D, GARCIA-CANEDO A. (1992) Efficacy of baculoviruses and their impact on pest management programs. En: COPPING, L.G.; GREEN, M.; REES, R. (Eds.). Pest management in soybean. London: Elsevier, 1992. p.88-97.

FUXA JR. (1979) Interactions of the microsporidium *Vairimorpha necatrix* with a bacterium, virus, and fungus in *Heliothis zea*. Journal of Invertebrate Pathology 33, 316-323.

GLADSTONE S, Y HRUSKA A. (2003) Una Guía para Promover el Manejo de Plagas más Seguro y más Eficaz con los Pequeños Agricultores: una Contribución al Cumplimiento Ambiental de la USAID-APP, CARE USA Atlanta, Georgia (CARE, 2003). p.104.

GOETTEL MS, ELLENBERG J, Y GLARE T. (2005) Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. En: GILBERT LI, IATROU K, Y GILL SS. (eds), Comprehensive Molecular Insect Science, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. pp. 6: 361-405.

GRAF B, Y ROMAN JQ. (2000) Control ecológico de la polilla de la papa en almacén. En: Plantas con potencial biocida. Metodologías y experiencias para su desarrollo. ARNING I, VELÁSQUEZ H (Eds.). Red de Acción en Alternativas al uso de Agroquímicos. Lima. pp. 131-134.

GRÖNER A. (1989) Safety to nontarget invertebrates of baculoviruses. En: LACEY L, Y DAVISON EW (Eds.). Safety of microbial insecticides. Boca Raton: CRC, 1989. p.135-147.

GRÖNER A. (1986) Specificity and safety of baculoviruses. En: GRANADOS RR, Y FEDERICI, BA. The biology of baculoviruses. (Eds.) CRC Press, Boca Raton. Vol.1, pp177-202.

HARPER, JD. (1986) Interactions between baculoviruses and other entomopathogens, chemical pesticides and parasitoids. En: The Biology of Baculoviruses: Practical Application for Insect Control. GRANADOS R, Y FEDERICI B (eds.). Vol. 2. CRC Press, Boca Raton, Florida. 275 p.

HAFEZ M, ZAKI FN, MOURSAY A, Y SABBOUR M. (1997) Biological effects of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Seller). Anz. Schadl. Pflanz. Umwelt. 70: 158-159.

HAJEK AE, Y St. LEGER RJ. (1994) Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annu. Rev. Entomol. 39, 293–322.

HERNÁNDEZ CS, ANDREW R, BEL Y, Y FERRÉ J. (2005) Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from potato-growing areas in Bolivia. Journal of Invertebrate Pathology 88, 8-16.

HOFFMANN MP, Y FRODSHAM AC. (1993) Natural Enemies of Vegetable Insect Pests. Cooperative Extension, Cornell University, Ithaca, NY. 63 pp. En Biological Control: A Guide



to Natural Enemies of North America. Cornell University. Weedden, Shelton, Li and Hoffman (Eds).

HOMINICK WM, Y COLLINS SA. (1997) Application of ecological information for practical use of insect pathogenic nematodes. In “Microbial Insecticides: Novelty or Necessity?”. Proc. Br. Crop Prot. Council Symp. 68, 73–82. En LACEY LA, LACEY R, FRUTOS HK. KAYA, Y VAIL P. (2001). Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? Biological Control 21, 230–248.

HORTON MH, Y BURAND JP. (1993) Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. Journal of Virology, 67, 1860-1868.

HUBER J, Y HUGUES PR. (1984) Quantitative bioassay in insect pathology. Bulletin of the Entomology Society of America, 30, 154-159.

HUGER A. (1963) Granuloses of insects, p. 531- 575. En: TWEETEN KA, BULLA LA. JR. Y CONSIGLI RA. (1981) Applied and Molecular Aspects of Insect Granulosis Viruses. Microbiological Reviews, 45, 379-408.

HUGUES PR, Y WOOD HA. (1981) A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses. J. Invertebr. Pathol., 37, 154 – 159.

HUNTER- FUJITA FR, ENTWINSTLE PF, EVANS HF, Y CROOK NE. (1998) Insect Viruses and pest management. 620pp, Jhon Willey y Sons Ltd., Baffins Lane, Chichester.

HUNTER DK, HOFFMANN DF, Y COLLIER SJ. (1975) Observations on a granulosis virus of the potato tuberworm, *Phthorimaea operculella*. Journal of Invertebrate Pathology, 26, 397-400.

IPCS, (1999) Environmental Health Criteria 217, *Bacillus thuringiensis*. United Nations Environment Programme. International Labour Organization. World Health organization. International Programme On Chemical Safety. Geneva 1999. Epub. <http://www.intox.org/databank/Bacillusthuringiensis.htm> 9/5/2005.

KAEHLIN P, MOREL M, Y GADANI F. (1994) Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricone*. Appl. Environ. Microbiol. 60, 19–25.

KAYA HK. (1990) Soil ecology. En: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control (GAUGLER R, Y KAYA HK. Eds.), pp. 93–115. CRC Press, Boca Raton, FL.

KAYA HK, Y STOCK SP. (1997) Techniques in insect nematology. En: “Manual of Techniques in Insect Pathology” (L. A. LACEY, Ed.). pp. 281–324. Academic Press, London.

KARAMANLIDOU G, LAMBROPOULOS AF, KOLAIS SI, MANOISIS T, ELLAR D, Y KASTRITSIS C. (1991) Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to laboratory populations of the olive fruit fly (*Dacus oleae*). Appl. Environ. Microbiol. 57: 2277-2282.

KLEIN, M. Y PODOLER, H. (1978) Studies on the application of a nuclear polyhedrosis virus to control populations of the Egyptian cotton-worm, *Spodoptera littoralis*. J. Invertebr. Pathol., 32, 244-248.

KRIEG A. (1971) Interactions between pathogens. Microbial Control of Insects and Mites (ed H.D.B.N.W. Hussey). Academic Press, London and New York.

KROSCHER J. (1995) Integrated pest management in potato production in Yemen with special references to the integrated biological control of the potato tuber moth (*Phthorimaea operculella* Zeller). Margraf Verlag, Weikersheim, Germany. 227p.

KROSCHER J, Y SPORLEDER M. (2006) Ecological approaches to Integrated Pest Management of the Potato Tuber Moth, *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera, Gelechiidae) pp.85-94 En: Proceedings of the 45th Annual Washington State Potato Conference. Moses Lake, Washington.

KROSCHER J, Y KOCH W. (1996) Studies on the use of chemicals, botanicals and *Bacillus thuringiensis* in the management of the potato tuber moth in potato stores. Crop Protection 15, 197-203.

LAARIF A, FATTOUCH S, ESSID W, MARZOUKI N, BEN SALAH H, Y BEN HAMMOUDA MH. (2003) Epidemiological survey of *Phthorimaea operculella* granulosis virus in Tunisia. Blackwell Publishing. EPPO/OEPP Bulletin, 33, 335-338.

LACEY LA, FRUTOS R, KAYA HK, Y VAIL P. (2001) Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? Biological Control 21, 230–248.

LACEY LA, Y GOETTEL MS. (1995) Current development in microbial control of insect pest and prospects for the early 21st century. Entomophaga 40(1): 3-27.

LACEY LA, Y ARTHURS SP. (2006) Microbial Control of the Potato Tuber Moth (Lepidoptera: Gelechiidae), Yakima Agricultural Research Laboratory, USDA-ARS 5230 Konnowac Pass Road Wapato, WA 98951 USA.

LACEY LA, HORTON DR, CHAUVIN RL, Y STOCKER JM. (1999) Comparative efficacy of *Beauveria bassiana*, *Bacillus thuringiensis*, and aldicarb for control of Colorado potato beetle in an irrigated desert agroecosystem and their effects on biodiversity. Entomol. Exp. Applic. 93: 189-200.

LAGNAOUI A, CAÑEDO V, Y DOUCHES DS. (2000) Evaluation of BT-cry1Ia1 (cryV) transgenic potatoes on two species of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* and *Symmetrischema tangolias* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Perú. Research on Potato. CIP Program Report 1999-2000: 117-120.

LARRAÍN P, GRAÑA F, Y VÁSQUEZ C. (2004) Efecto de la feromona sexual de *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) como técnica de trampeo masivo en la reducción del daño en tubérculos de papa. Suplemento Revista Latinoamericana de la Papa. Panel 125.

McEWEN FL, Y HERVEY GER. (1959) Microbial control of two cabbage insects. Journal of Insect Pathology 1, 86-94.

McVAY JR, GUDAUSKAS RT, Y HARPER JD. (1976) Effects of *Bacillus thuringiensis* nuclear-polyhedrosis virus mixtures on *Trichoplusia ni* larvae. Journal of Invertebrate Pathology 29, 367-372.

MAMIYA Y. (1989) Comparison of the infectivity of *Steinernema kushidai* (Nematode: Steinernematidae) and other steinernematid and heterorhabditid nematodes for three different host insects. Appl. Entomol. Zool. 24, 302–308.

MARTIGNONI ME. (1984) Baculovirus: an attractive biological alternative. En: GARNER WY, Y HARVEY JR J. (Eds.) Chemical and biological controls in forestry. pp.55–67 American Chemical Society, Washington, D.C.:

MARTIGNONI ME, Y IWAI PJ. (1978) Activity standardization of technical preparations of douglas-fir tussock moth baculovirus. J. Econ. Entomol. 71, 473–476.

MARTIGNONI ME, Y IWAI PJA. (1986) Catalog of viral diseases of insects, mites, and ticks. 4. ed. Portland, OR: USDA-Forest Service, 1986. 51p. (USDA. PNW-195).

MARTINEZ MH, Y SÁNCHEZ JM. (1998) Presencia y Sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* en Granos de almacén. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán. pp. 17-25.

MATTHIESEN JN, CHRISTIAN RL, GRACE TDC, Y FILSHIE BK. (1978) Large-scale field propagation and purification of the granulosis virus of the granulosis virus of the potato moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). Bull. Ent. Res., 68, 385-391.

MCVAY JR, GUDAUSKAS RT, Y HARPER JD. (1976) Effects of *Bacillus thuringiensis* nuclear-polyhedrosis virus mixtures on *Trichoplusia ni* larvae. Journal of Invertebrate Pathology 29, 367-372.

MEADOWS MP, ELLIS DJ, JARRET P, Y BURGESS HD. (1992) Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. Appl. Environ. Microbiol. 58, 1344-1350.

MEDRANAO GMA, LUNA OHA, Y SÁNCHEZ-YÁÑEZ JM. 1999. Sobrevivencia de Células Vegetativas de *Bacillus thuringiensis* en la Espermósfera/Rizósfera de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). FCB-UANL. Monterrey, Nuevo León.

MINAG, (2008) Producción anual de papa 2008. Dirección General de Información Agraria (DGIA) del Ministerio de Agricultura (Minag), epub. <http://postperu.blogspot.com/2008/04/produccion-de-papa-crecer-5-este-ao-y.html/27/10/2008>.

MONZON A. (2001) Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos en Nicaragua CATIE-GTZ. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 63, 95-103.

MOSCARDI F. (1990) Uso de entomopatógenos no manejo integrado de plagas da soja no Brasil. En: FERNANDES OA, CORREIA ACB, Y BORTOLI SA (Eds.). Manejo integrado de plagas e nematóides. Jaboticabal: FUNEP. p. 207-220.

MOSCARDI F. (1998) Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. En: ALVES SB. (Ed.). Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 509-539.

MOSCARDI F, Y SOSA-GÓMEZ DR. (1992 - 1993) A case study in biological control: soybean defoliating caterpillars in Brazil. En: International Crop Science Congress, 1.

NGUYEN KB, Y SMART GC.JR. (1991). Pathogenicity of *Steinernema scapterisci* to selected invertebrates. J. Nematol. 23, 7-11.

OECD, (2002) Consensus Document on Information used in the Assessment of Environmental Applications involving Baculovirus, Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology, No.20. ENV/JM/MONO 1. p. 13-14.

OJEDA D, Y CASTRO A. (1972) Introducción al estudio de los gelechidos en el norte peruano. Rev. Per. Entom. 15 (1), 125-131.

ONORE G, ZEDAM J, BARRAGAN A, SUQUILLO J, Y PUMISACHO M. (2006) Proyecto “Biopesticide Development and Diffusion of Potato Moths Integrated Management to Strengthen Food Security in the Ecuadorian Andes”. The Mc Night Foundation, INIAP, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, IRD. Informe Anual N°. 1. 2006. 12p.

ORTEGA E. (1995) Tecnología para el control integrado de la palomilla de la papa. FONAIAP Divulga 12(48): 15-19.

ORTEGA E, Y FERNÁNDEZ S. (2000) Manejo Integrado de la Polilla Minadora de la Papa *Phthorimaea operculella*. Editada en versión electrónica por: BOLAÑOS JF, IICA ACT Ecuador FONAIAP, PROCIANDINO, PRACIPA. Quito Julio de 2000, 41 p.

O'REILLY DR, MILLER LK, Y LUCKOW VA. (1992) Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. Salt Lake City, UT: W.H. FREEMAN, 1992. 347p.

PALACIOS M. (1997) Producción de Tubérculos-semillas de Papa. Manual de Capacitación. Principales Plagas de la Papa: La Polilla de la Papa y La Mosca Minadora. CIP. Fascículo 3, 7-97. 12p.

PALACIOS M. (1998) Planeación estratégica para el manejo de *Tecia solanivora* en Colombia. Memorias. Ministerio de Agricultura; Colciencias; FEDEPAPA; IICA. pp. 61-68. . Santa Fe de Bogota (Colombia). 22-24 Jul 1998. Entomólogo, CIP, Perú.

PAYNE CC. (1986) Insect pathogenic viruses as pest control agents. Fortschritte der Zoologie, 32, 183-200.

POINAR GO.JR. (1979) "Nematodes for Biological Control of Insects." CRC Press, Boca Raton, FL.

POKHARKAR DS, Y KURHADE VP. (1999) Cross infectivity and effect of environmental factors on the infectivity of granulosus virus of *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). J. Biol. Contr. 13: 79-84.

PRINGLE CR. (1998) The universal system of virus taxonomy of the International Committee on Virus Taxonomy (ICTV), including new proposals ratified since publication of the Sixth ICTV Report in 1995. Arch Virol 143: 1.

PROINPA, (1999) Biología y Comportamiento de la Polilla de la Papa *Symmetrischema tangolias*. Proyecto MIP – POLILLA, Fundación para la Promoción e Investigación de Productos Andinos (PROINPA) Publicación co-financiada por el Proyecto Papa Andina. Cochabamba - Bolivia. Ficha técnica No 2-1999: 5p. (4 pp)

RADCLIFFE EB. (1982) Insect pests of potato. Annual Review of Entomology, 27, 173-204.

RAMAN KV, Y PALACIOS M. (1994) Control Integrado de la polilla de la papa. Boletín de Capacitación del Centro Internacional de la Papa. Lima Perú. N° 4.

RAMAN KV. (1980) La Polilla de la Papa. Boletín de Información Técnica 3. Centro Internacional de la Papa. Lima Perú. 14pp.

RAMAN KV. (1988) Manejo integrado de las plagas de la papa en los países del tercer mundo. Centro Internacional de la Papa. Circular 16(1). Lima, Perú. 17p.

REED EM. (1969) A granulosis virus of potato moth. The Australian Journal of Science 31, 300-301.

REED M, Y SRINGETT (1971) Factors affecting the status of a virus as a control agent for the potato moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lep. Gelechiidae). Bull Entomol Res 61, 207-222.

ROMAN DX. (1998) Bioensayos de campo y análisis económico de la producción del virus de la poliedrosis nuclear *Spodoptera frugiperda*. Publicación del Zamorano departamento de protección vegetal, agosto de 1998. Honduras. 89p.

SÁNCHEZ Y AQUINO. (1986) La polilla de la papa *Symmetrischema plaesiosema*. Instituto Nacional de Investigación y Promoción Agropecuaria. Lima. 21 p

SALAMA HS, RAGAEI M, Y SABBOUR M. (1995) Larvae of *Phthorimaea operculella* (Zeller) as affected by various strains of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Applied Entomology 119, 241-243.

SALAMA HS, Y SALEM SA. (2000) *Bacillus thuringiensis* and neem seed oil (*Azadirachta indica*) effects on the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zeller in the field and stores. Archives of Phytopathology and Plant Protection 33, 73-80.

SETIAWATI W, SOERIAATMADJA RE, RUBIATI T, Y CHUJOY E. (1999) Control of potato tuber moth (*Phthorimaea operculella*) using an indigenous granulosis virus in Indonesia. Indonesian Journal of Crop Science 14, 10-16.

SEWIFY GH, ABOL-ELA S, Y ELDIN MS. (2000) Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) and granulosis virus (GV) combinations on the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera : Gelechiidae). Bull. Faculty Agric., Univ. Cairo. 51: 95-106.

SHIEH TR. (1988) Biological Insecticide and Biotechnology. American Chemical Society. 17, 207-216.

SMITH RF. (1975) Why are baculoviruses necessary for plant production? p. 6 En: TWEETEN KA, BULLA LA.JR, Y CONSIGLI RA. (1981) Applied and Molecular Aspects of Insect Granulosis Viruses. Microbiological Reviews, 45(3), 379-408.

SPORLEDER M. (2003) The granulovirus of the Potato Tuber Moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) – Characterisation and prospects for Effective Mass Production and Pest Control. Tropical Agriculture, Advances in Crop Research, Vol 3. editado por JÜRGEN KROSHEL. 2003, 196 p.

SPORLEDER M, KROSCHER J, HUBER J, Y LAGNAOUI A. (2005) An improved method to determine the biological activity (LC<sub>50</sub>) of the granulovirus *PoGV* in its host *Phthorimaea operculella*. Entomologia Experimentalis et Applicata 116 (3), 191–197.

STEINHAUS A. (1956) Insect pathology, vol. 1. Academic Press, Inc., New York. En: TWEETEN KA, BULLA LA.JR, Y CONSIGLI R. A. (1981) Applied and Molecular Aspects of Insect Granulosis Viruses. Microbiological Reviews, 45(3), 379-408.

STELZER MJ. (1965) Susceptibility of the great basin tent caterpillar, *Malacosoma fragile* (Strech), to a nuclear-polyhedrosis virus and *Bacillus thuringiensis* Berliner. Journal of Invertebrate Pathology, 7, 122-125.

STELZER MJ. (1967) Control of a tent caterpillar, *Malacosoma fragile* invurva, with aerial application of a nuclear-polyhedrosis virus and *Bacillus thuringiensis*. Journal of Economical Entomology 60: 38-41.



STELZER MJ, NEISESS J, Y THOMPSON CG. (1975) Aerial applications of a nuclearpolyhedrosis virus and *Bacillus thuringiensis* against the Douglas fir tussock moth. Journal of Economical Entomology 68, 269-272.

TANADA Y, Y KAYA HK. (1993) Insect pathology. New York: Academic. 666p.

TWEETEN KA, BULLA LA.JR, Y CONSIGLI RA. (1981) Applied and Molecular Aspects of Insect Granulosis Viruses. Microbiological Reviews, Vol. 45, No. 3. sept. 1981, p. 379-408.

VAN RIE J, JANSEN S, Y REYNAERTS A. (1994) Engineered resistance against potato tuber moth. Advances in potato pest biology and management (eds ZEHNDER G, POWELSON M, JANSSON R, Y RAMAN K.), pp. 494-508. The American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul, Minnesota (USA).

VARGAS E, HIGUERAS M, CALZADO V, Y ALDEBIS H. (2003) Interacciones de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) y baculovirus en larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). Conferencias plenarias y resúmenes de las comunicaciones orales del III Congreso Nacional de Entomología Aplicada - IX Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Entomología Aplicada Ávila, Córdoba. p175.

VARGAS M. (2003) Caracterización de tres cepas de *Beauveria brogniartii* (Saccardo) Petch y su virulencia en *Phthorimaea operculella* (Séller) y *Symmetrischema tangolias* (Gyen). Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 80 pp.

VON ARX R. Y GEBHARDT F. (1990) Effects of a granulosis virus, and *Bacillus thuringiensis* on life-table parameters of the potato tubermoth, *Phthorimaea operculella*. Entomophaga, 35, 151-159.

WILSON MJ, GLEN DM, Y GEORGE SK. (1993) The rhabditid nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* as a potential biological control agent for slugs. Biocontr. Sci. Technol. 3, 503-511.

WILSON MJ, GLEN DM, WILTSHIRE CW, Y GEORGE SK. (1994) Mini-plot field experiments using the rhabditid nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* for biological control. *Biocontr. Sci. Technol.* 4, 103–113.

WILSON MJ, GLEN DM, GEORGE SK, Y HUGHES LA. (1995) Biocontrol of slugs in protected lettuce using the rhabditid nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita*. *Biocontr. Sci. Technol.* 5, 233–242.

WILSON MJ, Y GAUGLER R. (2000) Terrestrial mollusc pests. En “Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests” (LACEY LA, Y KAYA HK. Eds.), pp. 787– 804. Kluwer Academic, Dordrecht.

WINTERS P, Y FANO H. (1997) The economics of biological control in Peruvian potato production. En Working Paper Series - International Potato Center, pp. iv + 33 pp. (CIP), Lima.

WHITFORD F. (2006) Manual de Entrenamiento sobre lo Esencial Para los Aplicadores de Pesticidas de Indiana. Programas de Pesticidas de Purdue, Universidad de Purdue, Servicio de Extensión Cooperativa, 108p.

WRAIGHT SP, Y RAMOS MR. (2005) Synergistic interaction between *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis tenebrionis*-based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae. *Journal of Invertebrate Pathology.* 90, 139-150.

ZHANG XUNHAO, ZHANG CUIZHEN, HA ZHENQUAN, GAO FAKUN Y MENG FANSONG (1996) The application of Junduwei, a mixture of *Bt* and *HaNPV*, against the cotton bollworm. *Chinese Journal of Biological Control* 12 (1): 1-4.

ZEDDAM JL, VASQUEZ RM, VARGAS Z, Y LAGNAOUI A. (2003) Producción viral y tasas de aplicación del granulovirus usado para el control biológico de las polillas de la papa *Phthorimaea operculella* y *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Bol. Sanidad Vegetal, Plagas* 29: 659-667.

## IX ANEXOS

**Tabla 1.** Mortalidad natural en larvas de *P. operculella* en pruebas control de 26 bioensayos.

N° de bioensayo	N <sub>r</sub>	Promedio	Error estándar	Intervalo de confianza (95%)		Mínimo (larvas muertas)	Máximo (larvas muertas)	Subgrupos <sup>1</sup>
				Inferior	Superior			
1	6	27,6%	0,12%	21,8%	33,9%	13	16	e, f, g
2	6	18,4%	0,12%	13,5%	23,9%	5	12	a, b, c, d, e
3	6	21,0%	0,12%	15,8%	26,7%	9	12	b, c, d, e, f
4	6	13,8%	0,12%	9,5%	18,8%	4	8	a, b, c
5	6	12,8%	0,12%	8,6%	17,6%	1	10	a, b
6	4	19,8%	0,17%	13,6%	26,7%	7	14	a, b, c, d, e, f
7	6	29,8%	0,12%	23,8%	36,1%	10	21	f, g
8	6	19,1%	0,12%	14,1%	24,7%	6	12	a, b, c, d, e
9	4	16,2%	0,17%	10,6%	22,8%	5	11	a, b, c, d
10	4	14,1%	0,17%	8,9%	20,4%	4	10	a, b, c
11	6	22,9%	0,12%	17,5%	28,8%	8	13	c, d, e, f
12	6	14,4%	0,12%	10,0%	19,4%	3	12	a, b, c
13	6	13,8%	0,12%	9,5%	18,8%	4	8	a, b, c
14	6	12,8%	0,12%	8,6%	17,6%	1	10	a, b
15	4	23,3%	0,17%	16,7%	30,7%	10	16	c, d, e, f
16	4	12,7%	0,17%	7,7%	18,6%	4	10	a, b
17	6	37,4%	0,12%	31,0%	44,0%	13	28	h, i
18	6	14,0%	0,12%	9,7%	19,0%	2	10	a, b, c
19	6	11,1%	0,12%	7,2%	15,7%	3	8	a,
20	6	24,2%	0,12%	18,7%	30,2%	10	15	d, e, f
21	6	19,9%	0,12%	14,8%	25,5%	5	16	a, b, c, d, e, f
22	4	12,7%	0,17%	7,7%	18,6%	4	10	a, b
23	5	15,3%	0,14%	10,4%	21,0%	4	10	a, b, c, d
24	6	41,9%	0,12%	35,3%	48,6%	16	28	i
25	6	42,1%	0,12%	35,5%	48,8%	12	28	i
26	4	44,9%	0,17%	36,8%	53,2%	17	30	i
<b>Total</b>	<b>141</b>	<b>20,7%</b>	<b>0,005%</b>	<b>19,6%</b>	<b>21,9%</b>	<b>1</b>	<b>30</b>	

<sup>1</sup> Los subgrupos homogéneos se muestran con las mismas letras (Prueba de Tukey,  $p > 0,05$ ).

N<sub>r</sub> Número de repeticiones en cada bioensayo. Se infestaron con 50 larvas neonatas por repetición o unidad de análisis.

**Tabla 2.** Mortalidad natural en larvas de *S. tangolias* en pruebas control de 13 bioensayos.

N° de bioensayo	N <sub>r</sub>	Promedio	Error estándar	Intervalo de confianza (95%)		Mínimo (larvas muertas)	Máximo (larvas muertas)	Subgrupos <sup>1</sup>
				Límite inferior	Límite superior			
1	4	40,5%	0,17%	32,4%	48,8%	17	24	c, d, e
2	6	22,8%	0,12%	17,3%	28,8%	8	15	a, b
3	6	30,3%	0,12%	24,2%	36,8%	8	25	b, c, d
4	6	43,6%	0,12%	36,8%	50,4%	15	28	f
5	4	32,5%	0,17%	24,9%	40,6%	15	18	b, c, d, e
6	4	33,5%	0,17%	25,8%	41,6%	16	18	b, c, d, e
7	4	28,9%	0,17%	21,6%	36,8%	12	17	b, c
8	4	28,9%	0,17%	21,6%	36,8%	12	17	b, c
9	4	24,1%	0,17%	17,3%	31,6%	8	16	a, b
10	6	16,1%	0,12%	11,4%	21,5%	5	10	a
11	4	35,9%	0,17%	28,1%	44,2%	15	20	c, d, e
12	4	38,7%	0,17%	30,7%	47,0%	12	25	c, d, e
13	4	41,9%	0,17%	33,8%	50,3%	17	26	d, e
TOTAL	60	31,8%	0,01%	29,8%	33,9%	5	28	

<sup>1</sup> Los subgrupos homogéneos se muestran con las mismas letras (Prueba de Tukey,  $p > 0,05$ ).

N<sub>r</sub> Número de repeticiones por cada bioensayo. Se infestaron con 50 larvas neonatas por cada repetición o unidad de análisis.

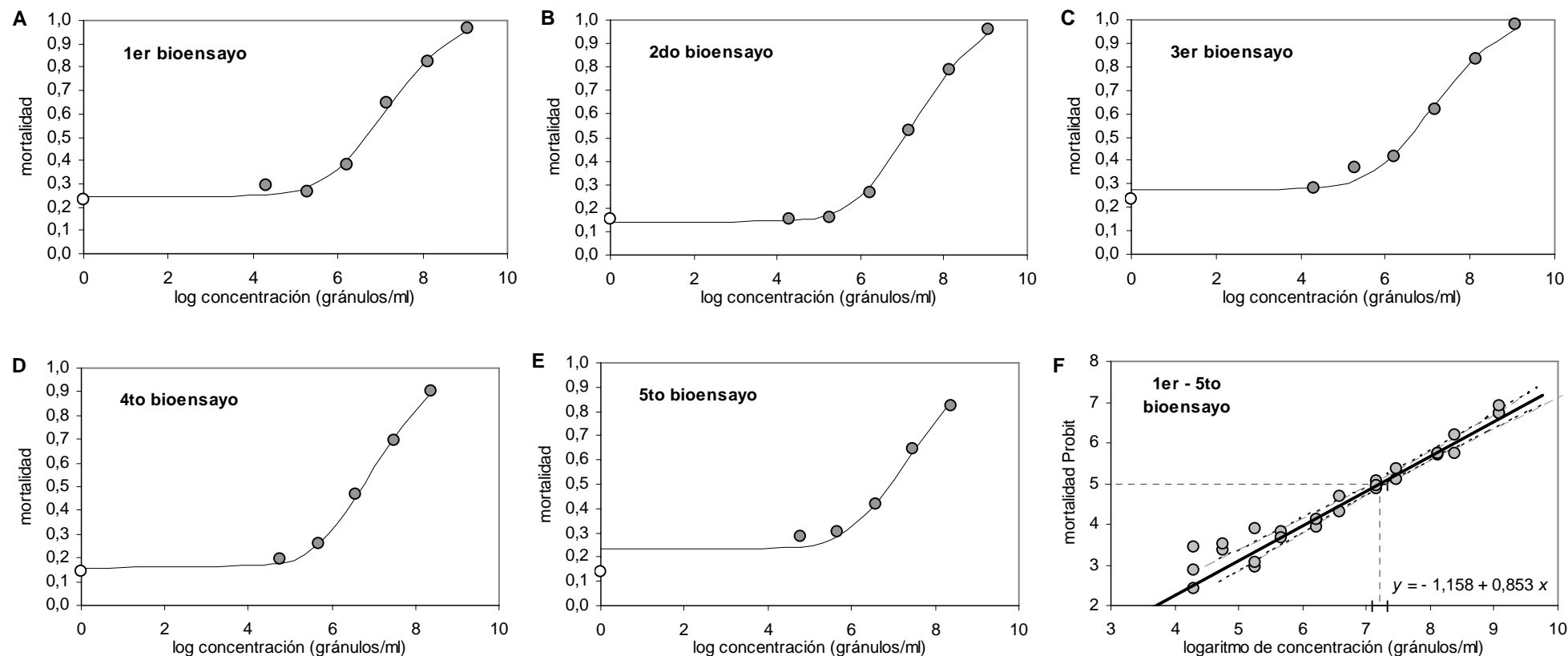
**Tabla 3.** Relación entre mortalidad Probit de larvas de *P. operculella* y concentración de *PoGV* aplicado por inmersión de tubérculos de papa en suspensión acuosa del patógeno e inoculadas con larvas de estadio neonatal en 5 bioensayos.

Bioensayo No. <sup>b</sup>	Ecuación <sup>a</sup> Modelo Probit	$\chi^2$	Prob.	CL <sub>50</sub> <sup>c</sup> (gránulos/mL)		Índice de toxicidad <sup>c</sup>	
1	$y = -1,138 + 0,853x$	5,39	0,25	$1,56 \times 10^7$	$(1,11 \times 10^7 - 2,17 \times 10^7)$	1,000	(0,695 - 1,427)
2	$y = -1,234 + 0,853x$	3,86	0,42	$2,02 \times 10^7$	$(1,39 \times 10^7 - 2,93 \times 10^7)$	0,773	(0,554 - 1,065)
3	$y = -1,125 + 0,853x$	5,58	0,23	$1,51 \times 10^7$	$(8,97 \times 10^6 - 2,51 \times 10^7)$	1,036	(0,665 - 1,603)
4 (+)	$y = -0,971 + 0,853x$	1,21	0,75	$9,95 \times 10^6$	$(6,08 \times 10^6 - 1,62 \times 10^7)$	1,570	(1,122 - 2,172)
5 (+)	$Y = -1,317 + 0,853x$	4,41	0,22	$2,53 \times 10^7$	$(1,75 \times 10^7 - 3,68 \times 10^7)$	0,617	(0,435 - 0,862)

<sup>a</sup>  $y$  = Probit,  $x$  = logaritmo de concentración de *PoGV* (gránulos/mL); desviación estándar de la pendiente común  $\pm 0,02$ .

<sup>b</sup>(+) Los bioensayos se llevaron a cabo como parte de otros con exposición a combinación de patógenos. El número de concentraciones fue 6 en los bioensayos 1-3; y 5 en los bioensayos 4-5. El número de larvas usadas por concentración fue  $n = 300$ , a excepción del bioensayo 3 ( $n = 200$ ). Cada bioensayo incluyó una prueba control con el mismo número de larvas mencionado.

<sup>c</sup> Los números en paréntesis son los límites de confianza al nivel de 95%; debido a que la heterogeneidad fue grande ( $p < 0,15$ ) se incluyó un factor de heterogeneidad ( $h = 1,44$ ) para calcular los intervalos de confianza.



**Figura 8. Curvas de mortalidad y línea de regresión Probit en larvas de *P. operculella* expuestas a *PoGV*, aplicado en suspensión acuosa sobre tubérculos de papa.** Las mortalidades fueron retransformadas mediante el modelo Probit (tabla 3) incluyendo mortalidad natural (A - E). La línea de regresión Probit con el 95% de sus intervalos de confianza incluye los datos agrupados de los 5 bioensayos (F). Los círculos grises son los datos observados; los círculos blancos sobre los ejes Y en las figuras A – E son las mortalidades control. Las líneas continuas (A - F) son las mortalidades esperadas según el modelo Probit.

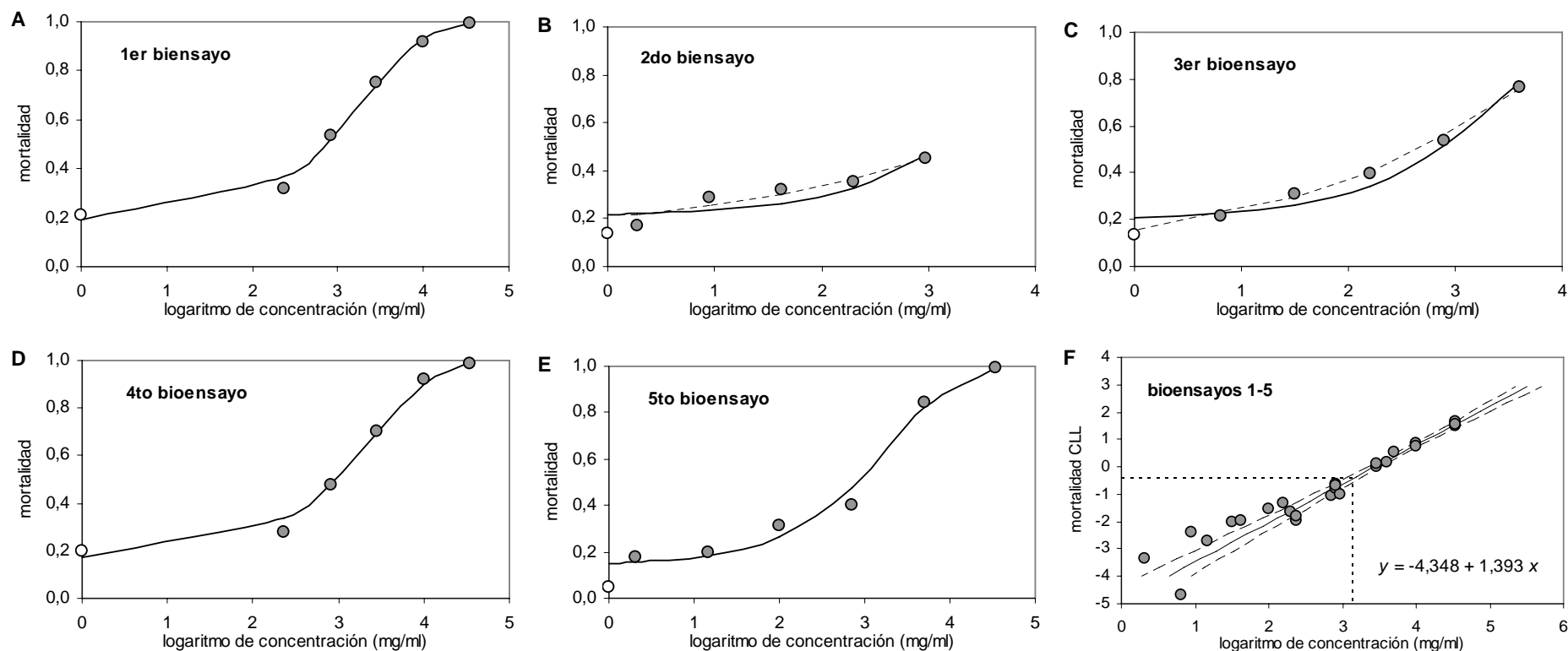
**Tabla 4.** Relación entre mortalidad CLL de larvas de *P. operculella* y concentración de *Btk* aplicado por inmersión de tubérculos de papa en suspensión acuosa del patógeno e inoculadas con larvas de estadio neonatal en 5 bioensayos.

Bioensayo No. <sup>b</sup>	Ecuación <sup>a</sup> Modelo CLL	$\chi^2$	Prob.	CL <sub>50</sub> <sup>c</sup> (mg/litro) ó (32 000 UI/litro)		Índice de toxicidad <sup>c</sup>	
1	$y = -4,770 + 1,393x$	3,22	0,36	$1,45 \times 10^3$	$(8,05 \times 10^2 - 2,21 \times 10^3)$	1	(0,853 – 1,253)
2 (+)	$y = -5,107 + 1,393x$	15,8	<0,01	$2,53 \times 10^3$	$(1,48 \times 10^2 - 4,73 \times 10^4)$	0,573	(0,259 – 0,982)
3 (+)	$y = -4,749 + 1,393x$	7,82	0,05	$1,40 \times 10^3$	$(8,11 \times 10^2 - 2,33 \times 10^3)$	1,035	(0,702 – 1,371)
4	$y = -4,809 + 1,393x$	3,71	0,29	$1,54 \times 10^3$	$(7,74 \times 10^2 - 2,63 \times 10^3)$	0,937	(0,770 – 1,205)
5	$y = -4,713 + 1,393x$	8,48	0,08	$1,32 \times 10^3$	$(6,41 \times 10^2 - 2,25 \times 10^3)$	1,099	(0,903 – 1,364)

<sup>a</sup>  $y$  = mortalidad CLL,  $x$  = logaritmo de concentración de *Btk* (mg DiPel 2X/litro; cada mg de DiPel 2X equivale a 32000 UI según información técnica consignada en la etiqueta del producto); desviación estándar de la pendiente común  $\pm 0,058$ .

<sup>b</sup>(+) Los bioensayos se llevaron a cabo como parte de otros con exposición a combinación de patógenos. El número de concentraciones fue 5 en los bioensayos 1-4; y 6 en el bioensayo 5. El número de larvas usadas por concentración fue  $n = 300$  (bioensayos 1-3), y  $n = 200$  en los bioensayos 4-5. Cada bioensayo incluyó un tratamiento control con el mismo número de larvas,  $n$ , mencionado.

<sup>c</sup> Los números en paréntesis son los límites de confianza al nivel de 95%; debido a que la heterogeneidad fue grande ( $p < 0,05$ ) un factor de heterogeneidad ( $h = 4,48$ ) ha sido incluido para calcular los intervalos de confianza.



**Figura 9. Curvas de mortalidad y línea de regresión CLL en larvas de *P. operculella* expuestas a *Btk*, aplicado en suspensión acuosa sobre tubérculos de papa.** Los índices de mortalidad fueron retransformados a partir del modelo CLL (tabla 4) incluyendo mortalidad natural (A-E). La línea de regresión CLL con 95% de intervalos de confianza para los datos agrupados de los 5 bioensayos (F). Los círculos grises representan los datos observados; los círculos blancos sobre los ejes Y son las mortalidades control. Las líneas continuas son las predicciones del modelo (A-F). Las líneas discontinuas en B y C representan las líneas individuales utilizadas para determinar las mortalidades esperadas debido a *Btk* en los bioensayos con combinación de patógenos.



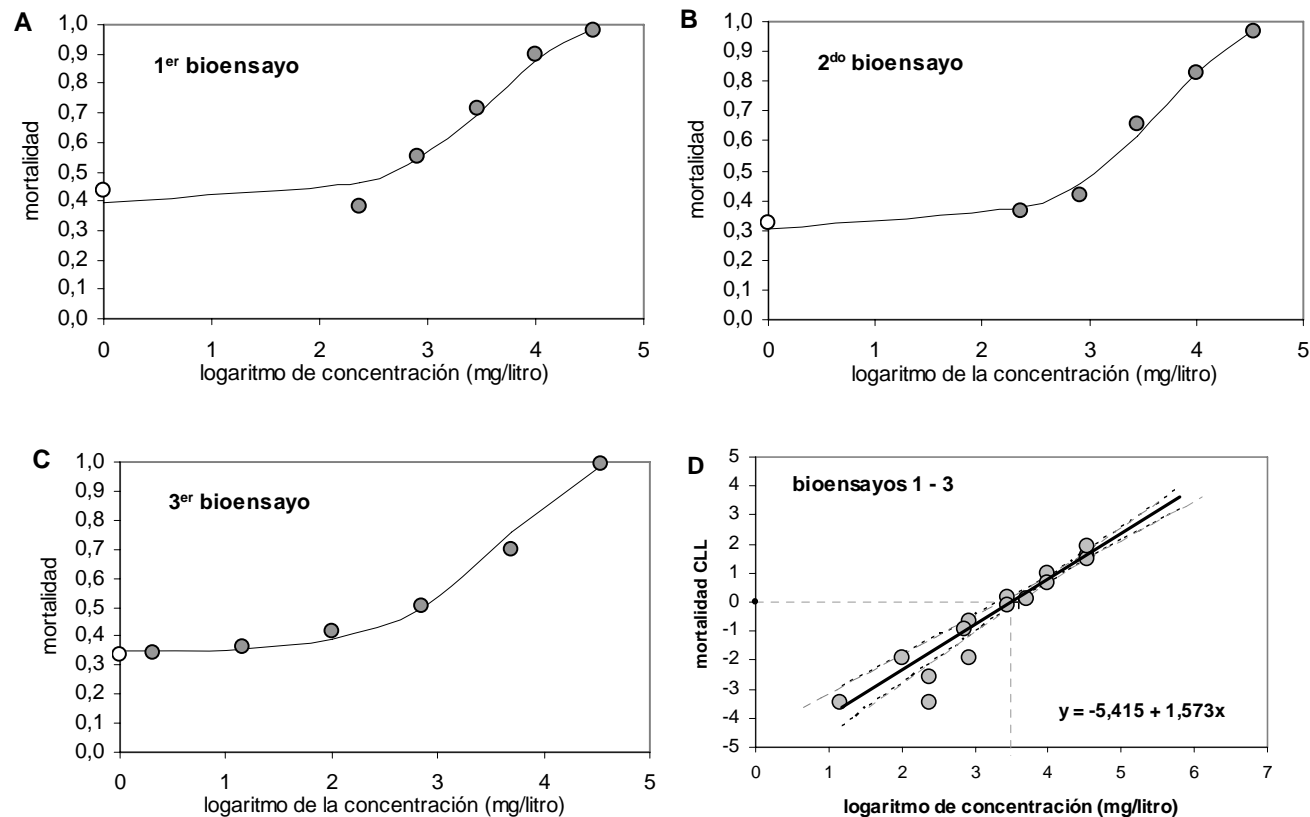
**Tabla 5.** Relación entre mortalidad CLL de larvas de *S. tangolias* y concentración de *Btk* aplicado por inmersión de tubérculos de papa en suspensión acuosa del patógeno e inoculados con larvas de estadio neonatal en 3 bioensayos.

Bioensayo		Ecuación <sup>a</sup> Modelo CLL	<i>Chi</i> <sup>2</sup>	Prob.	CL <sub>50</sub> <sup>c</sup> (mg/litro) ó (32 000 UI/litro)		Índice de toxicidad <sup>c</sup>	
No. <sup>b</sup>	N							
1	1500	$y = -5,832 + 1,573x$	12,2	>0,05	$2,97 \times 10^3$	$(1,77 \times 10^3 - 4,52 \times 10^3)$	1	(0,77 - 1,28)
2	1000	$y = -5,968 + 1,573x$	3,17	0,36	$3,63 \times 10^3$	$(2,09 \times 10^3 - 5,77 \times 10^3)$	0,819	(0,61 - 1,06)
3	1200	$y = -5,832 + 1,573x$	5,59	0,23	$2,98 \times 10^3$	$(1,50 \times 10^3 - 5,30 \times 10^3)$	0,999	(0,74 - 1,32)

<sup>a</sup>  $y$  = mortalidad CLL,  $x$  = logaritmo de la concentración de *Btk* (mg DiPel 2X/litro; cada mg de DiPel 2X equivale a 32000 UI según información técnica consignada en la etiqueta del producto); desviación estándar de la pendiente común  $\pm 0,079$ .

<sup>b</sup> El número de concentraciones fue 5 en los bioensayos 1-2; y 6 en el bioensayo 3. El número de larvas usadas por concentración fue  $n = 300$  en el bioensayo 1; y en los bioensayos 2 y 3 fueron  $n = 200$ . Cada bioensayo incluyó un tratamiento control con el mismo número de larvas,  $n$ , mencionado.

<sup>c</sup> Los números en paréntesis son los límites de confianza al nivel de 95%; debido a que la heterogeneidad fue grande ( $p < 0,15$ ), se incluyó un factor de heterogeneidad para calcular los intervalos de confianza.



**Figura 10. Curvas de mortalidad y línea de regresion CLL de larvas de *S. tangolias* expuestas a *Btk* aplicado en suspensión acuosa sobre tubérculos de papa.** Los índices fueron retransformados a partir del modelo CLL (tabla 5) incluyendo mortalidad natural (A – C). La Línea de regresión CLL con 95% de intervalos de confianza para los datos agrupados de los 3 bioensayos (D). Los círculos grises representan los datos observados; los círculos blancos sobre los ejes Y en las figuras A - C muestran las mortalidades control. Las líneas continuas son las predicciones del modelo (A -D).

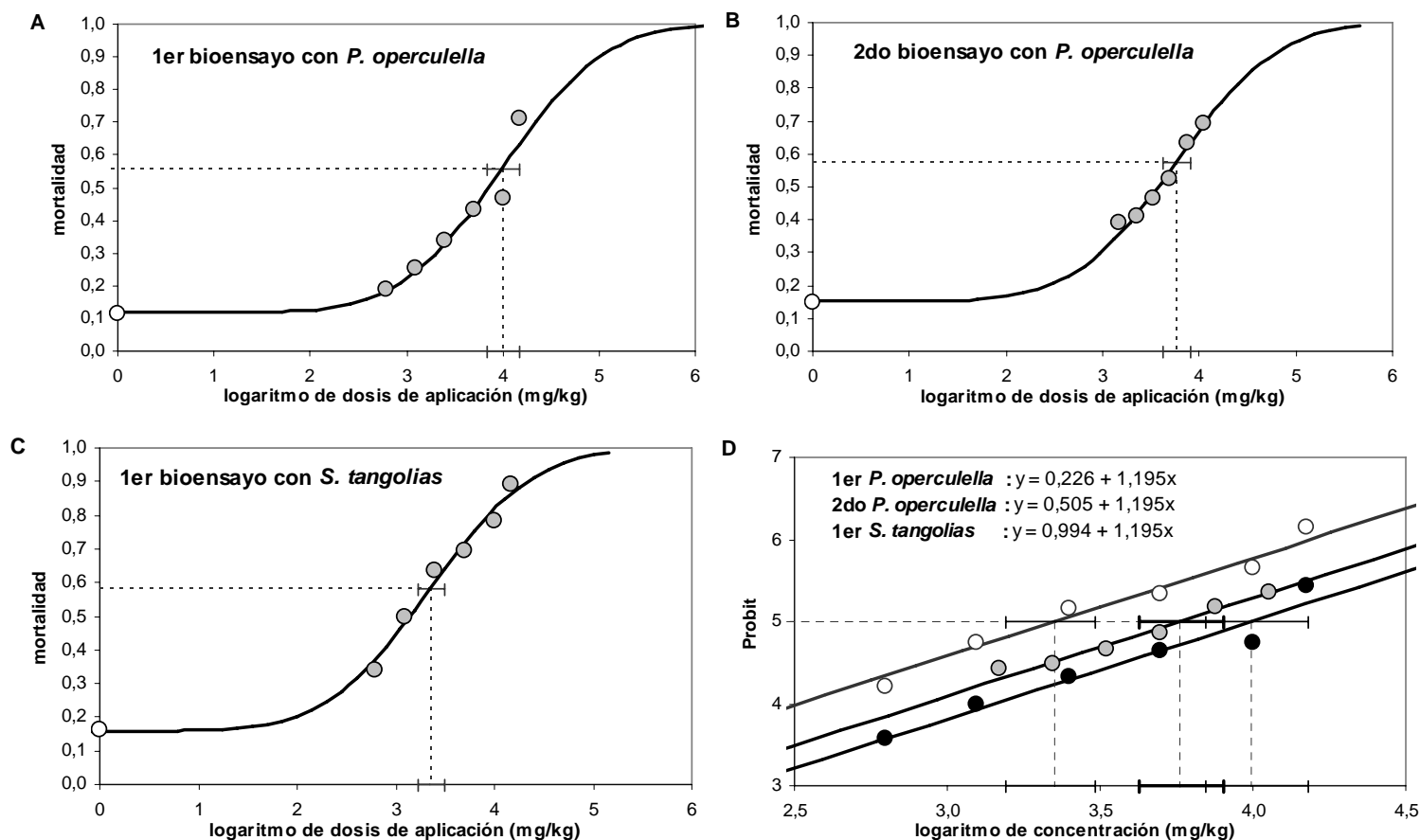
**Tabla 6.** Relación entre mortalidad Probit de larvas de *P. operculella* y *S. tangolias* respecto a la dosis de talco aplicado por impregnación en tubérculos de papa e inoculadas con larvas de estadio neonatal evaluado en 3 bioensayos.

Bioensayo No. <sup>b</sup>		Ecuación <sup>a</sup> Modelo Probit	$Chi^2$	Prob.	DL <sub>50</sub> <sup>c</sup> (mg/kg)		Índice de Toxicidad <sup>c</sup>	
Po(1)	1800	$y = 3,812 + 1,195x$	18,7	> 0,01	9,863	(6,986 – 15,208)	1,000	(0,778 – 1,286)
Po(2)	1800	$y = 4,091 + 1,195x$	3,15	0,53	5,761	(4,269 – 8,070)	1,712	(1,255 – 2,183)
St(1)	1800	$y = 4,580 + 1,195x$	8,27	0,08	2,256	(1,567 – 3,049)	4,392	(3,217 – 6,403)

<sup>a</sup>  $y$  = Probit,  $x$  = logaritmo de dosis de aplicación de talco (mg de talco/kg de papa); desviación estándar de la pendiente común  $\pm 0,075$ .

<sup>b</sup> *Po* y *St* hacen referencia a *P. operculella* y *S. tangolias* respectivamente. El número de dosis fue 6 en cada bioensayo. El número de larvas usadas por dosis fue  $n = 300$  en todos los bioensayos. Los bioensayos incluyeron un tratamiento control sin talco, donde el número de larvas,  $n$ , fue el mismo.

<sup>c</sup> Los números en paréntesis corresponden a los límites de confianza al nivel de 95%; debido a que la heterogeneidad fue grande ( $p < 0,05$ ) se introdujo un factor de heterogeneidad para calcular los intervalos de confianza.



**Figura 11. Curvas de mortalidad y regresión Probit de larvas de *P. operculella* y *S. tangolias* debido a tubérculos de papa tratados con diferentes dosis de talco.** Los índices de mortalidad fueron retransformados a partir del modelo Probit (tabla 6) incluyendo mortalidad natural. Los valores de  $DL_{50}$  obtenidos a partir del análisis Probit con el 95% de sus intervalos de confianza son indicados por las barras. En las figuras A-C los círculos gris representan los datos observados; los círculos blancos sobre los ejes Y son las mortalidades control. En D los círculos negros y grises son los datos observados para *P. operculella* en los bioensayos  $Po(1)$  y  $Po(2)$ ; los círculos blancos son los datos observados para *S. tangolias* en el bioensayo  $St(1)$ . Las líneas continuas curvas y rectas son las predicciones del modelo.

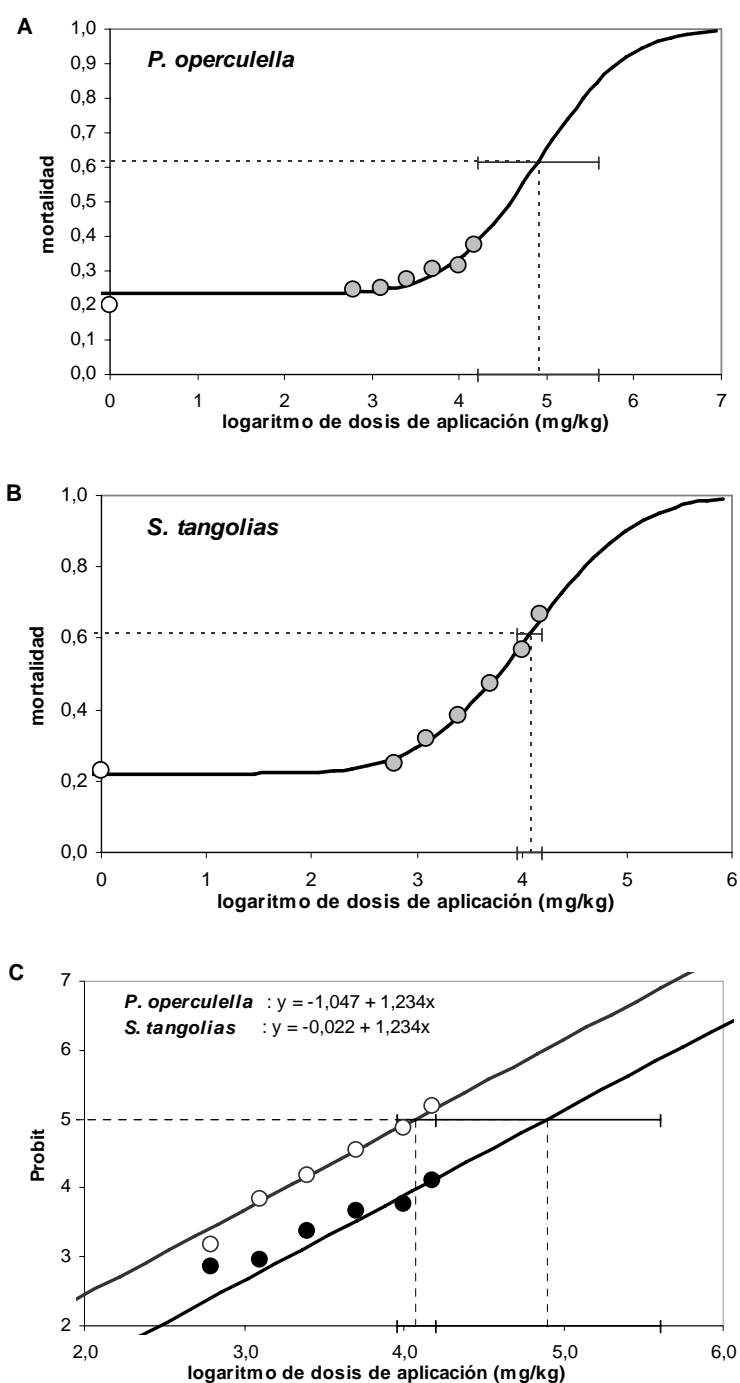
**Tabla 7.** Relación entre mortalidad Probit de larvas neonatas de *P. operculella* y *S. tangolias* respecto a la dosis de caolín aplicado por impregnación en tubérculos de papa e inoculadas con larvas de estadio neonatal evaluado en 2 bioensayos.

Bioensayo No. <sup>b</sup>		Ecuación <sup>a</sup> Modelo Probit	$\chi^2$	Prob.		DL <sub>50</sub> <sup>c</sup> (mg/kg)	Índice de Toxicidad <sup>c</sup>	
Po	1800	$y = -1,047 + 1,234x$	1,44	0,837	$7,94 \times 10^4$	$(1,60 \times 10^4 - 4,03 \times 10^5)$	1,000	(0,564 – 1,774)
St	1800	$y = -0,022 + 1,234x$	1,32	0,858	$1,17 \times 10^4$	$(9,00 \times 10^3 - 1,54 \times 10^4)$	6,761	(4,150 – 11,171)

<sup>a</sup>  $y$  = Probit,  $x$  = logaritmo de dosis de aplicación de caolín (mg de caolín / kg de papa); desviación estándar de la pendiente común  $\pm 0,057$ .

<sup>b</sup> Po y St hacen referencia a *P. operculella* y *S. tangolias* respectivamente. El número de dosis fue 6 en ambos bioensayos. El número de larvas usadas por dosis fue  $n = 300$ . Los bioensayos incluyeron un tratamiento control sin caolín donde el número de larvas,  $n$ , fue el mismo.

<sup>c</sup> Los números en paréntesis corresponden a los límites de confianza al nivel de 95%.



**Figura 12. Curvas de mortalidad y regresión Probit de larvas de *P. operculella* y *S. tangolias* debido a tubérculos de papa tratados con diferentes dosis de caolín.** Los índices de mortalidad fueron retransformados a partir del modelo Probit (tabla 7) incluyendo mortalidad natural. Los valores de  $DL_{50}$  obtenidos del análisis Probit con el 95% de sus intervalos de confianza son indicados por las barras. En A - B los círculos gris representan los datos observados; los círculos blancos sobre los ejes Y son las mortalidades control. En C los círculos negros son los datos observados para *P. operculella*; los círculos blancos son los datos observados para *S. tangolias*. Las líneas continuas curvas y rectas son las predicciones del modelo.

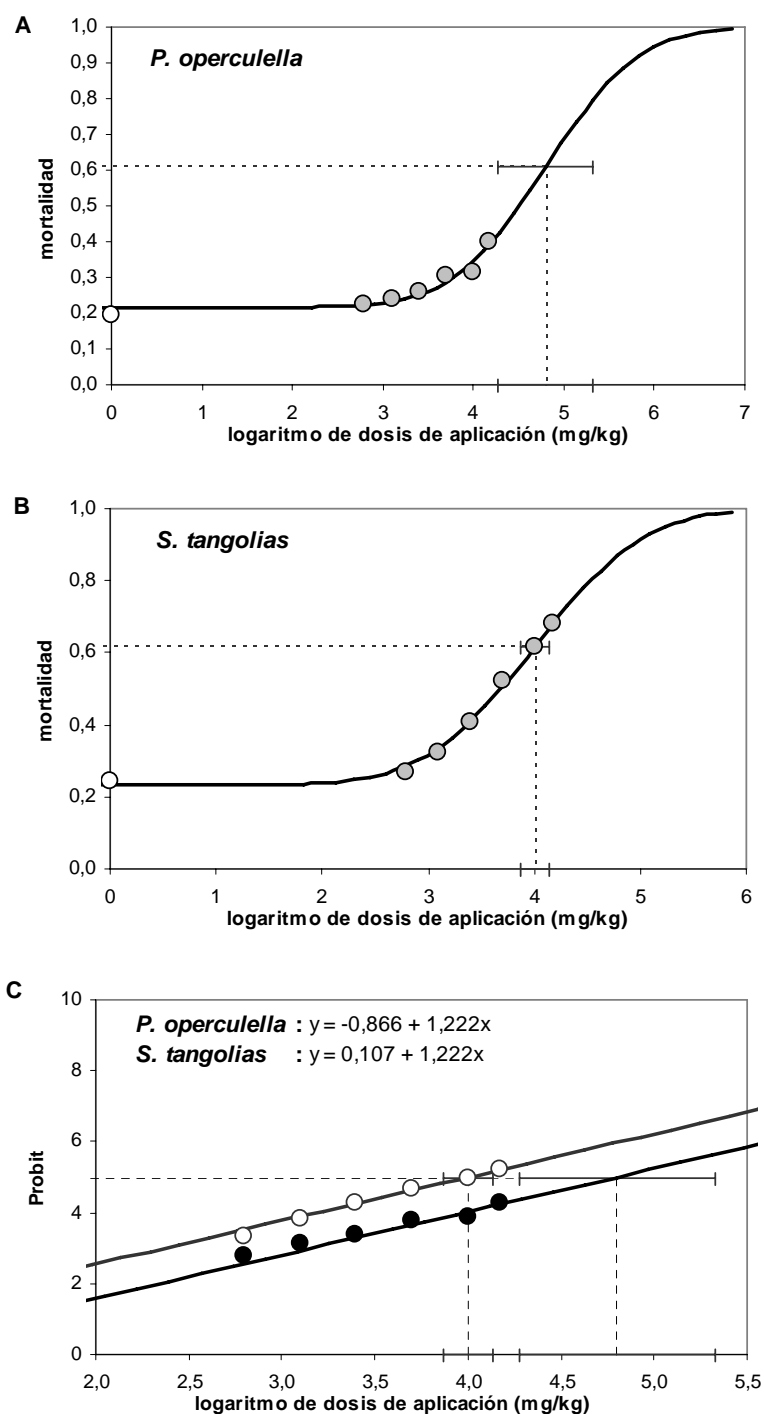
**Tabla 8.** Relación entre mortalidad Probit de larvas de *P. operculella* y *S. tangolias* respecto a la dosis de cal aplicado por impregnación en tubérculos de papa e inoculados con larvas de estadio neonatal evaluado en 2 bioensayos.

Bioensayo		Ecuación <sup>a</sup>	<i>Chi</i> <sup>2</sup>	Prob.	DL <sub>50</sub> <sup>c</sup> (mg/kg)	Tasa de toxicidad <sup>c</sup>		
No. <sup>b</sup>	Modelo Probit							
1	1800	y = -0,866 + 1,222x	1,91	0,752	6,28×10 <sup>4</sup>	(1,90×10 <sup>4</sup> – 2,12×10 <sup>5</sup> )	1,000	(0,604 – 1,656)
2	1200	y = 0,107 + 1,222x	0,53	0,970	1,00×10 <sup>4</sup>	(7,39×10 <sup>3</sup> – 1,37×10 <sup>4</sup> )	6,251	(3,901 – 10,183)

<sup>a</sup>  $y$  = Probit,  $x$  = de logaritmo de dosis de aplicación de cal (mg de cal por kg de papa); desviación estándar de la pendiente común  $\pm 0,063$ .

<sup>b</sup> *Po* y *St* hacen referencia a *P. operculella* y *S. tangolias* respectivamente. El número de dosis fue 6 en ambos bioensayos. El número de larvas usadas por cada dosis fue  $n = 300$  en *P. operculella* y  $n = 200$  en *S. tangolias*. Cada bioensayo incluyó un tratamiento control sin cal donde el número de larvas,  $n$ , fue el mismo.

<sup>c</sup> Los números en paréntesis corresponden a los límites de confianza al nivel de 95%.



**Figura 13. Curvas de mortalidad y regresión Probit de larvas de *P. operculella* y *S. tangolias* debido a tubérculos de papa tratados con diferentes dosis de cal.** Los índices de mortalidad fueron retransformados a partir del modelo Probit (tabla 8) incluyendo mortalidad natural. Los valores de  $DL_{50}$  obtenidos del análisis Probit con el 95% de sus intervalos de confianza son indicados por las barras. En A y B los círculos gris representan los datos observados; los círculos blancos sobre los ejes Y son las mortalidades control. En C los círculos negros son los datos observados para *P. operculella*; los círculos blancos son los datos observados para *S. tangolias*. Las líneas continuas son las predicciones del modelo.



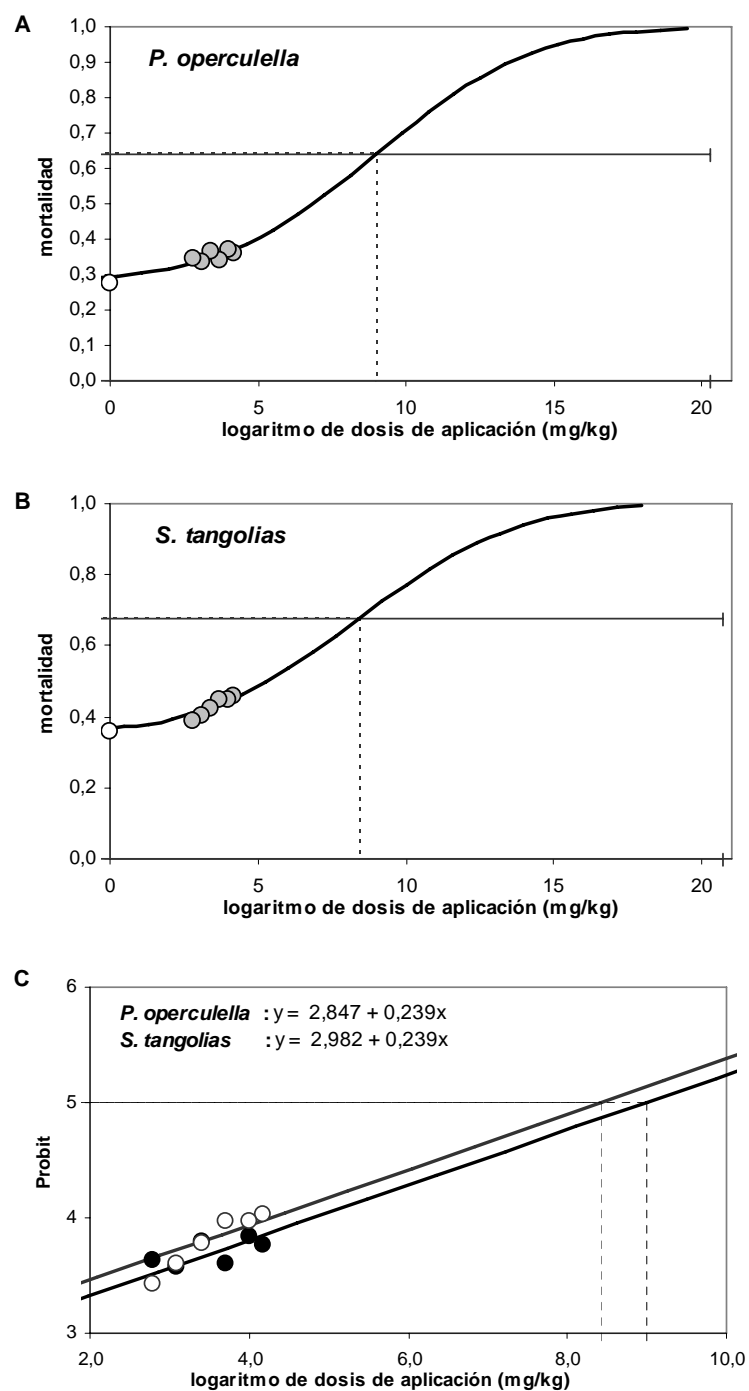
**Tabla 9.** Relación entre mortalidad Probit de larvas de *P. operculella* y *S. tangolias* respecto a la dosis de arena aplicado por impregnación en tubérculos de papa e inoculados con larvas de estadio neonatal evaluado en 2 bioensayos.

Bioensayo No. <sup>b</sup>		Ecuación <sup>a</sup> Modelo Probit	$Chi^2$	Prob.		DL <sub>50</sub> <sup>c</sup> (mg/kg)	Índice de Toxicidad <sup>c</sup>	
Po(1)	1800	$y = 2,847 + 0,239x$	1,07	0,898	$9,73 \times 10^8$	$(1,29 \times 10^{-2} - 1,81 \times 10^{20})$	1	(0,047 – 21,229)
St(1)	1200	$y = 2,982 + 0,239x$	0,68	0,953	$2,65 \times 10^8$	$(3,28 \times 10^{-4} - 4,81 \times 10^{20})$	3,672	(0,118 – 125,543)

<sup>a</sup> y = mortalidad Probit, x = logaritmo de dosis de aplicación de arena (mg de arena / kg de papa); desviación estándar de la pendiente común  $\pm 0,045$ .

<sup>b</sup> Po y St hacen referencia a *P. operculella* y *S. tangolias* respectivamente. El número de dosis fue 6 en ambos bioensayos. El número de larvas usadas por cada dosis fue  $n = 300$  en *P. operculella* y  $n = 200$  en *S. tangolias*. Cada bioensayo incluyó un tratamiento control sin arena donde el número de larvas,  $n$ , fue el mismo.

<sup>c</sup> Los números en paréntesis corresponden a los límites de confianza al nivel de 95%.



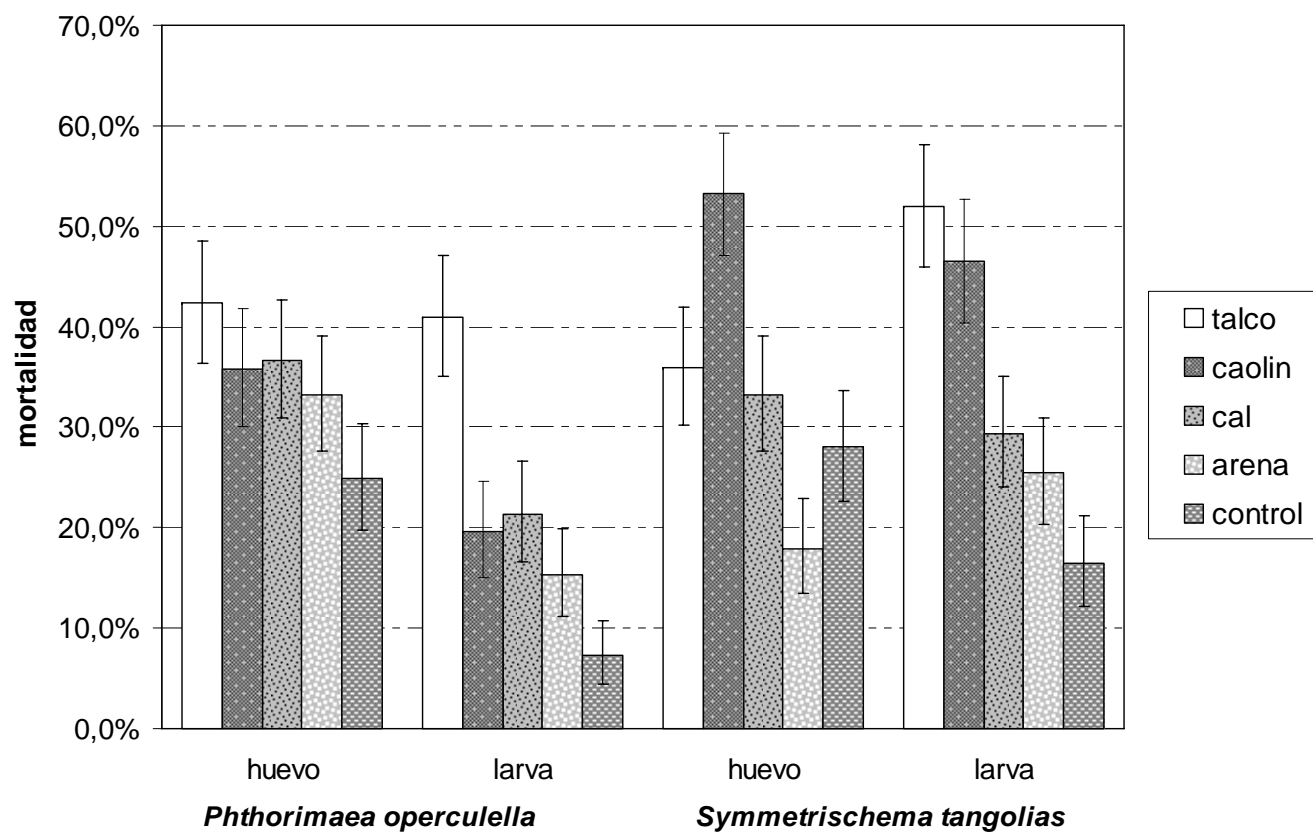
**Figura 14. Curvas de mortalidad y regresión Probit de larvas de *P. operculella* y *S. tangolias* debido a tubérculos de papa tratados con diferentes dosis de arena. Los índices de mortalidad fueron retransformados a partir del modelo Probit (tabla 9) incluyendo mortalidad natural. Los valores de  $DL_{50}$  obtenidos del análisis Probit con el 95% de sus intervalos de confianza son indicados por las barras. En A y B los círculos grises representan los datos observados; los círculos blancos sobre los ejes Y son las mortalidades control. En C los círculos negros son los datos observados para *P. operculella* y los círculos blancos para *S. tangolias*. Las líneas continuas son las predicciones del modelo.**

**Tabla 10.** Mortalidad larval de *P. operculella* y *S. tangolias*, expuestas e inoculadas en estadio de huevo y larva neonatal sobre tubérculos de papa tratados con diferentes materiales inertes en una dosis de 5 g por kg.

Material inerte	<i>Phthorimaea operculella</i> <sup>2</sup>						<i>Symmetrischema tangolias</i> <sup>2</sup>						Sub grupo <sup>1</sup>
	Huevo			Larva			Huevo			Larva			
	Mortalidad (%)	Intervalo de confianza 95%		Mortalidad (%)	Intervalo de confianza 95%		Mortalidad (%)	Intervalo de confianza 95%		Mortalidad (%)	Intervalo de confianza 95%		
		Límite inferior (%)	Límite superior (%)		Límite inferior (%)	Límite superior (%)		Límite inferior (%)	Límite superior (%)		Límite inferior (%)	Límite superior (%)	
Talco	42,4	36,4	48,5	41,0	35,0	47,0	36,0	30,2	41,9	52,0	45,9	58,1	c
Caolín	35,8	30,1	41,8	19,6	15,0	24,7	53,3	47,1	59,3	46,5	40,4	52,6	c
Cal	36,7	30,9	42,6	21,4	16,6	26,6	33,2	27,6	39,1	29,4	24,0	35,1	b
Arena	33,2	27,6	39,1	15,3	11,1	19,9	17,9	13,5	22,9	25,4	20,3	30,9	a
Control	24,9	19,8	30,4	7,2	4,4	10,7	28,0	22,7	33,6	16,4	12,1	21,2	a

<sup>1</sup> Los subgrupos homogéneos (para los datos de las 2 especies en conjunto) se muestran con las mismas letras (Prueba de Tukey,  $p > 0.05$ ).

<sup>2</sup> El número de larvas neonatas de *P. operculella* y *S. tangolias* utilizadas para cada material inerte fue  $n = 200$ , mientras que el de huevos con variaciones entre 87 a 46. El bioensayo incluyó 2 tratamientos control sin aplicación de material inerte, donde en un caso el número de larvas neonatas,  $n$ , fue el mismo y en el otro con variaciones entre 75 a 77 huevos.



**Figura 15. Comparación de mortalidad de larvas de *P. operculella* y *S. tangolias* inoculadas y expuestas en estadio de larva neonatal y huevo sobre tubérculos de papa tratados con diferentes materiales inertes en una dosis de 5 g por kg. Las condiciones ambientales de temperatura proporcionadas en los bioensayos fueron 25°C para *P. operculella* y 20°C para *S. tangolias*. Las barras representan los límites de confianza al 95%.**

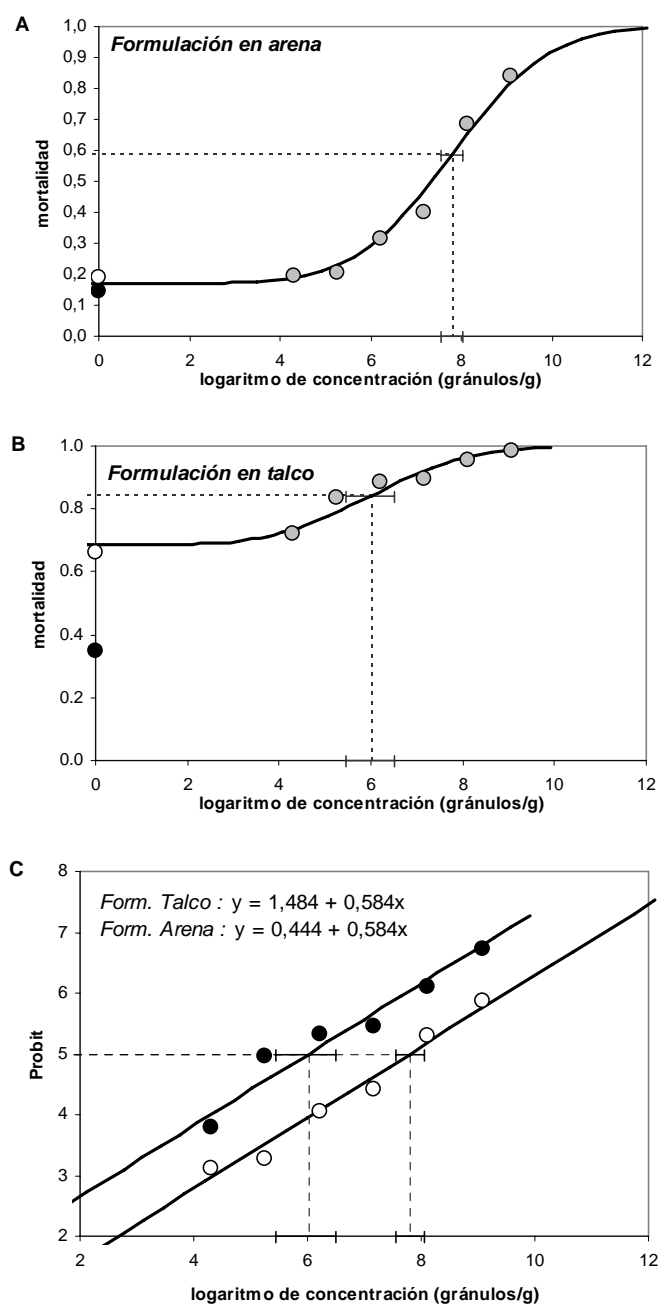
**Tabla 11.** Relación entre mortalidad Probit de larvas de *P. operculella* y concentración de *PoGV* en fórmulas en talco y polvo de arena, aplicados sobre tubérculos de papa en dosis de 5 g/kg e inoculados con larvas de estadio neonatal evaluado en 5 bioensayos.

Bioensayo		Ecuación <sup>a</sup>	$Chi^2$	Prob.	CL <sub>50</sub> <sup>c</sup> (gránulos/g)	Índice de toxicidad <sup>c</sup>	
Fórmula <sup>b</sup>	N	Modelo Probit					
Arena (1)	1200	$y = 0,444 + 0,485x$	6,47	0,167	$6,22 \times 10^7$	$(2,90 \times 10^7 - 1,35 \times 10^8)$	1,000 (0,444 – 2,253)
Talco (2)	1800	$y = 1,484 + 0,485x$	9,49	0,050	$1,03 \times 10^6$	$(3,77 \times 10^5 - 2,30 \times 10^6)$	60,161 (25,097 – 203,646)

<sup>a</sup> y = mortalidad Probit, x = log concentración de *PoGV* en la fórmula en talco y arena fina (gránulos de *PoGV*/g de fórmula) aplicado a tubérculos de papa; desviación estándar de la pendiente común  $\pm 0,040$ .

<sup>b</sup> Talco y Arena son los materiales inertes utilizados en las fórmulas de *PoGV*. El número de niveles de concentración fue 6 en ambos bioensayos con  $n = 200$  larvas utilizadas por concentración (1) ó  $n = 300$  larvas por concentración (2). Cada bioensayo incluyó dos tratamientos control; uno de talco o polvo de arena (material inerte sin patógeno en fórmula) y otro sin aplicación de material inerte, en todos los casos con el mismo número de insectos,  $n$ , mencionado.

<sup>c</sup> Los números en paréntesis corresponden a los límites de confianza al nivel de 95%.



**Figura 16. Curvas de mortalidad y regresión Probit en larvas de *P. operculella* debido a tubérculos de papa tratados con fórmulas de *PoGV* en talco y arena.** Los índices de mortalidad fueron retransformados a partir del modelo Probit (tabla 11) incluyendo mortalidad natural. Los valores de  $CL_{50}$  obtenidos a partir del análisis Probit con el 95% de sus intervalos de confianza son indicados por las barras. En A y B los círculos grises son las mortalidades observadas en los tratamientos con fórmula de *PoGV*; los círculos blancos sobre los ejes Y son las mortalidades control de material inerte (arena y talco); los círculos negros sobre los ejes Y son las mortalidades control sin aplicación de material inerte. En C los círculos negros y blancos son las mortalidades Probit observadas por efecto de las fórmulas de *PoGV* en talco y arena respectivamente. Las líneas continuas curvas y rectas son las predicciones del modelo.

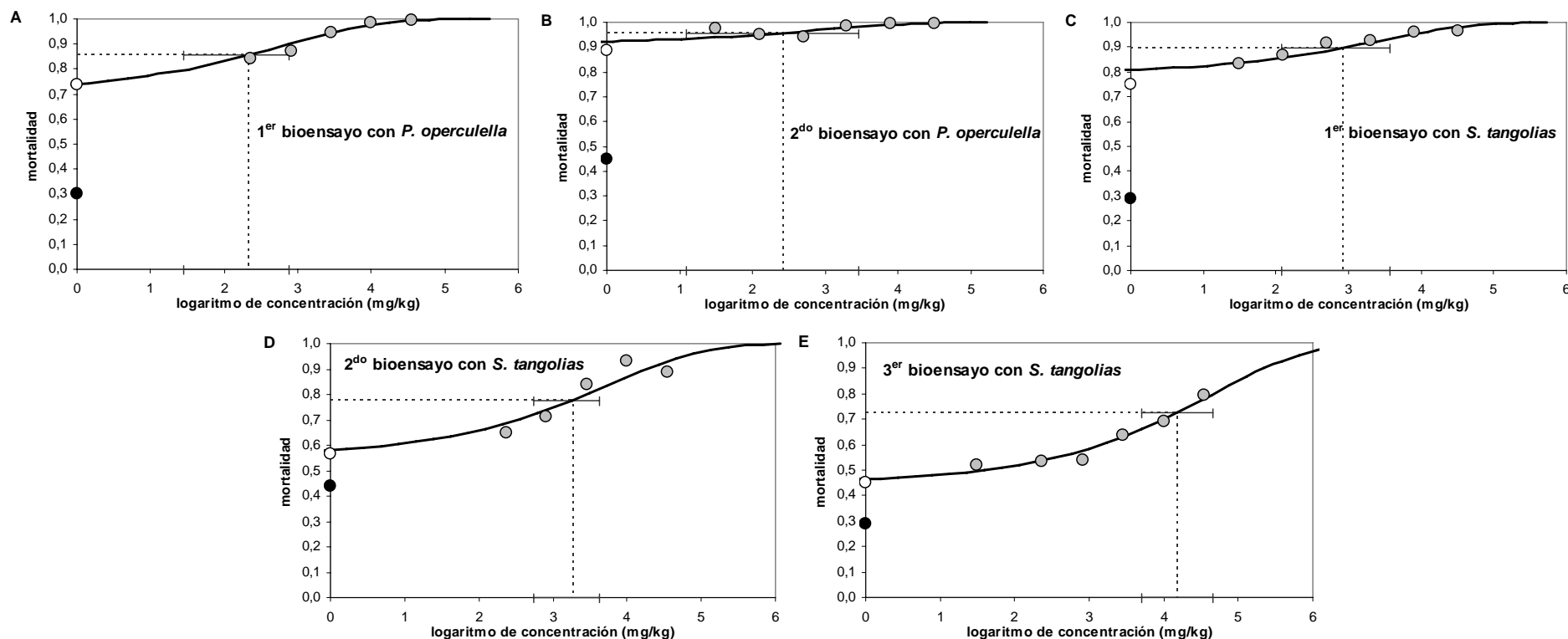
**Tabla 12.** Relación entre mortalidad CLL de larvas de *P. operculella* y *S. tangolias* y concentración de *Btk* en fórmula en talco aplicado sobre tubérculos de papa en dosis de 5 g/kg e inoculados con larvas de estadio neonatal evaluado en 5 bioensayos.

Bioensayo No. <sup>b</sup>	N	Ecuación <sup>a</sup> Modelo CLL	Chi <sup>2</sup>	Prob.	CL <sub>50</sub> <sup>c</sup> (mg/kg) (32 000 UI/kg)		Índice de toxicidad <sup>c</sup>	
Po (1)	1500	y = -2,16+ 0,769x	6,05	0,11	2,15×10 <sup>2</sup>	(2,83×10 <sup>1</sup> - 7,57×10 <sup>2</sup> )	1,000	(0,563 - 1,776)
Po (2)	1200	y = -2,23+ 0,769x	9,02	0,06	2,65×10 <sup>2</sup>	(1,25×10 <sup>1</sup> - 2,88×10 <sup>3</sup> )	0,812	(0,286 - 2,989)
St (3)	1200	y = -2,612+ 0,769x	4,73	0,31	8,33×10 <sup>2</sup>	(1,27×10 <sup>2</sup> - 3,72×10 <sup>3</sup> )	0,258	(0,092 - 0,726)
St (4)	1500	y = -2,868+ 0,769x	23,60	>0,01	1,79×10 <sup>3</sup>	(5,51×10 <sup>2</sup> - 4,18×10 <sup>3</sup> )	0,120	(0,047 - 0,226)
St (5)	1200	y = -3,575+ 0,769x	1,90	0,75	1,49×10 <sup>4</sup>	(5,04×10 <sup>3</sup> - 4,60×10 <sup>4</sup> )	0,010	(0,003 - 0,030)

<sup>a</sup> y = mortalidad CLL, x = logaritmo log concentración de *Btk* en la fórmula en talco (mg de DiPel 2X por kg de fórmula; cada mg de DiPel 2X equivale a 32000 UI según información técnica consignada en la etiqueta del producto) aplicado a tubérculos de papa; desviación estándar de la pendiente común ± 0,066.

<sup>b</sup> Po y St hacen referencia a *P. operculella* y *S. tangolias* respectivamente. El número de niveles de concentración fue 5 con n = 300 larvas utilizadas por concentración (bioensayos 1 y 4) ó 6 con n = 200 larvas utilizadas por concentración (bioensayos 2, 3, y 5). Cada bioensayo incluyó dos tratamientos control; uno de talco (material inerte sin patógeno en fórmula) y otro sin aplicación de material inerte, en ambos casos con el mismo número de insectos, n, mencionado.

<sup>c</sup> Los números en paréntesis corresponden a los límites de confianza al nivel de 95%; debido a que la heterogeneidad fue grande (p < 0,05) se incluyó un factor de heterogeneidad para calcular los intervalos de confianza.



**Figura 17. Curvas respuesta de mortalidad para larvas de *P. operculella* y *S. tangolias* debido a tubérculos de papa tratados con fórmulas de *Btk* (DiPel 2X) en talco.** Los índices de mortalidad fueron retransformados a partir del modelo CLL (tabla 12) incluyendo mortalidad control (talco sin *Btk*). Las líneas continuas son las predicciones del modelo. Se indican los valores CL<sub>50</sub> obtenidos por el análisis (líneas discontinuas) con intervalos de confianza al 95% (barras). En A - E los círculos grises son las mortalidades observadas en los tratamientos con fórmula de *Btk*, los círculos blancos corresponden a las mortalidades observadas en el control, tratado solamente con talco (talco sin *Btk*); los círculos negros son las mortalidades observadas en el control sin tratamiento.



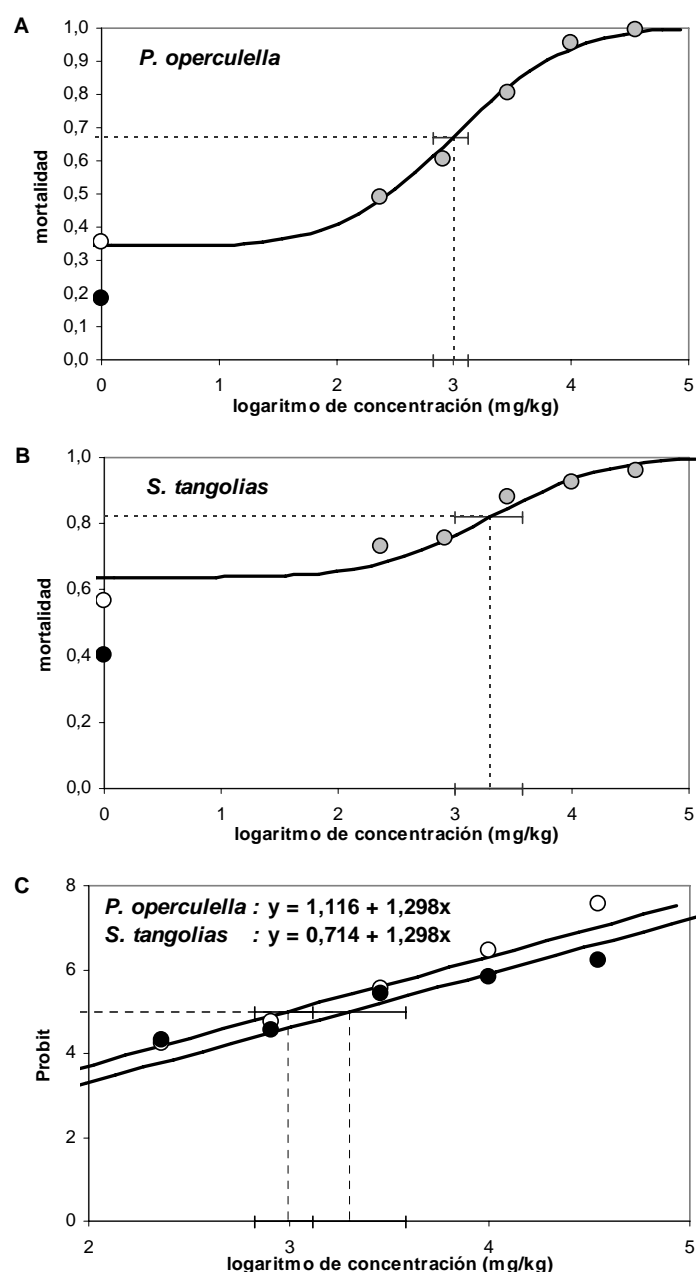
**Tabla 13.** Relación entre mortalidad Probit de larvas de *P. operculella* y *S. tangolias* y concentración de *Btk* en fórmula en polvo de arena, aplicado sobre tubérculos de papa en dosis de 5 g por kg e inoculados con larvas de estadio neonatal evaluado en 2 bioensayos.

Bioensayo		Ecuación <sup>a</sup>	$\chi^2$	Prob.	CL <sub>50</sub> <sup>c</sup>		Índice de toxicidad <sup>c</sup>	
No. <sup>b</sup>	N	Modelo Probit			(mg/kg) (× 32 000 UI/kg)			
Po (1)	1500	$y = 1,1160 + 1,298x$	6,27	0,099	$9,81 \times 10^2$	$(6,78 \times 10^2 - 1,32 \times 10^3)$	1,00	(0,668 – 1,497)
St (2)	1000	$y = 0,7139 + 1,298x$	8,78	0,032	$2,00 \times 10^3$	$(9,84 \times 10^2 - 3,80 \times 10^3)$	0,49	(0,274 - 0907)

<sup>a</sup>  $y$  = mortalidad Probit,  $x$  = log concentración de *Btk* en la fórmula de polvo de arena (mg de DiPel 2X / kg de fórmula; cada mg de DiPel 2X equivale a 32000 UI según información técnica consignada en la etiqueta del producto) aplicado a tubérculos; desviación estándar de la pendiente común  $\pm 0,075$ .

<sup>b</sup> *Po* y *St* hacen referencia a *P. operculella* y *S. tangolias* respectivamente. El número de niveles de concentración fue 5 en ambos bioensayos con  $n = 300$  larvas utilizadas por concentración (bioensayo 1) ó  $n = 200$  larvas por concentración (bioensayo 2). Cada bioensayo incluyó dos tratamientos control; uno de polvo de arena (material inerte sin patógeno en fórmula) y otro sin aplicación de material inerte, en ambos casos con el mismo número de insectos,  $n$ , mencionado.

<sup>c</sup> Los números en paréntesis corresponden a los límites de confianza al nivel de 95%.



**Figura 18. Curvas de mortalidad y regresión Probit en larvas de *P. operculella* y *S. tangolias* debido a *Btk* formulado en polvo de arena.** Las mortalidades fueron retransformados mediante el modelo Probit (tabla 13) incluyendo mortalidad control (polvo de arena sin *Btk*). Las líneas son las predicciones del modelo. Se indican los valores  $CL_{50}$  obtenidos por el análisis (líneas discontinuas) con intervalos de confianza al 95% (barras). En A y B los círculos gris son las mortalidades observadas en los tratamientos con fórmula de *Btk*; los círculos blancos sobre los ejes Y son las mortalidades control de polvo de arena (sin patógeno en fórmula); los círculos negros sobre los ejes Y son las mortalidades control sin aplicación de material inerte. En C los círculos blancos y negros son las mortalidades Probit observadas por efecto de las fórmulas de *Btk* en *P. operculella* y *S. tangolias* respectivamente. Las curvas y rectas continuas son las predicciones del modelo.

**Tabla 14.** Interacción entre *Btk* y *PoGV* sobre larvas *P. operculella* inoculadas en estadio de larva neonatal en el experimento 1.

	PoGV (gránulos/mL)	DiPel 2X (Btk) (mg/litro)	Mortalidad observada (%)	Modelo independiente <sup>1</sup>		Modelo aditivo <sup>2</sup>		Modelo antagonista <sup>3</sup>		Modo de interacción
				Mortalidad esperada (%)	Valores z a partir de prueba binominal	Mortalidad esperada (%)	Valores z a partir de prueba binominal	Mortalidad esperada (%)	Valores z a partir de prueba binominal	
PoGV	2,38x10 <sup>8</sup>	-	90,3	90,8	-0,197					
	2,98x10 <sup>7</sup>	-	69,7	68,6	0,451					
	3,73x10 <sup>6</sup>	-	46,7	45,1	0,588					
	4,66x10 <sup>5</sup>	-	25,7	29,3	-1,318					
	5,83x10 <sup>4</sup>	-	19,7	20,6	-0,317					
Btk	-	931,6	45,3	44,9	0,209					
	-	198,3	35,3	36,7	-0,421					
	-	42,2	32	30,2	0,739					
	-	9	28,7	25,3	1,394					
	-	1,9	17	21,7	<u>-1,935</u> *					
3:1	1,79x10 <sup>8</sup>	232,9	86,7	91,7	<u>-2,855</u> ***	88,5	-0,884	88,4	-0,842	Aditivo
	2,24x10 <sup>7</sup>	49,6	70,7	72,4	-0,612	65,4	<u>1,987</u> **	65,1	<u>2,104</u> **	Independiente
	2,80x10 <sup>6</sup>	10,5	49,0	51,1	-0,684	43,2	<u>2,085</u> **	42,4	<u>2,346</u> **	Independiente
	3,50x10 <sup>5</sup>	2,2	35,7	35,5	0,115	29,0	<u>2,579</u> ***	27,7	<u>3,071</u> ***	Independiente
	4,37x10 <sup>4</sup>	0,5	32	26,0	<u>2,399</u> **	21,5	<u>4,275</u> ***	19,8	<u>-∞</u> ***	Sinérgico
1:1	1,19x10 <sup>8</sup>	465,8	84,3	89,6	<u>-2,714</u> ***	84,7	-0,121	84,5	-0,025	Aditivo
	1,49x10 <sup>7</sup>	99,1	72	69,8	0,891	61,0	<u>4,070</u> ***	60,2	<u>4,321</u> ***	Independiente
	1,87x10 <sup>6</sup>	21,1	35,7	49,6	<u>-∞</u> ***	40,4	-1,544	38,9	-1,037	Antagonístico
	2,33x10 <sup>5</sup>	4,5	32,7	35,1	-0,809	28,0	<u>1,828</u> *	25,7	<u>2,752</u> ***	Independiente
	2,92x10 <sup>4</sup>	1	30	26,1	1,591	21,7	<u>3,429</u> ***	20,4	<u>4,014</u> ***	Independiente
1:3	5,97x10 <sup>7</sup>	698,7	70,7	85,0	<u>-∞</u> ***	77,5	<u>-2,688</u> ***	76,9	<u>-2,442</u> **	Antagonístico
	7,46x10 <sup>6</sup>	148,7	44,7	64,7	<u>-∞</u> ***	53,9	<u>-3,158</u> ***	52,3	<u>-2,591</u> ***	Antagonístico
	9,33x10 <sup>5</sup>	31,6	36	46,3	<u>-3,540</u> ***	36,6	-0,141	33,6	0,927	Aditivo
	1,17x10 <sup>5</sup>	6,7	22,7	33,5	<u>-4,023</u> ***	26,8	-1,585	24,5	-0,684	Aditivo
	1,46x10 <sup>4</sup>	1,4	20	25,5	<u>-2,165</u> **	21,7	-0,647	21,1	-0,392	Aditivo
Control	-	-	14,0	0,125	0,8567					

<sup>1</sup>  $P_{12} = P_1 + P_2 - (P_1 \times P_2)$ .

<sup>2</sup> Los dos componentes producen un efecto similar a la suma algebraica del efecto de ambos.

<sup>3</sup>  $P_{12} = \max(P_1; P_2)$ .

**Tabla 15.** Interacción entre *Btk* y *PoGV* sobre larvas de *P. operculella* inoculadas en estadio de larva neonatal en el experimento 2.

	<i>PoGV</i> (gránulos/mL)	<i>DiPel</i> 2X ( <i>Btk</i> ) (mg/litro)	Mortalidad observada (%)	Modelo independiente <sup>1</sup>		Modelo aditivo <sup>2</sup>		Modelo antagonista <sup>3</sup>		Modo de interacción
				Mortalidad esperada (%)	Valores z a partir de prueba binominal	Mortalidad esperada (%)	Valores z a partir de prueba binominal	Mortalidad esperada (%)	Valores z a partir de prueba binominal	
<i>PoGV</i>	2,38x10 <sup>8</sup>	-	82,3	82,8	-0,162					
	2,98x10 <sup>7</sup>	-	64,3	62,3	0,792					
	3,73x10 <sup>6</sup>	-	41,7	43,9	-0,703					
	4,66x10 <sup>5</sup>	-	30,3	31,3	-0,306					
	5,83x10 <sup>4</sup>	-	28,3	24,0	<u>1,807</u> *					
<i>DiPel</i>	-	4000	76,3	75,9	0,248					
	-	800	53,7	56,3	-0,869					
	-	160	39,3	40,3	-0,289					
	-	32	30,7	29,7	0,441					
	-	6,4	21,7	23,3	-0,612					
3:1	1,79x10 <sup>8</sup>	1000	83,3	90,1	<u>-3,565</u> ***	80,8	1,204	79,7	<u>1,660</u> *	Aditivo
	2,24x10 <sup>7</sup>	200	68,7	71,6	-1,052	59,8	<u>3,254</u> ***	58,5	<u>3,689</u> ***	Independiente
	2,80x10 <sup>6</sup>	40	47,3	51,2	-1,267	41,4	<u>2,127</u> **	40,4	<u>2,492</u> **	Independiente
	3,50x10 <sup>5</sup>	8	34	35,5	-0,492	29,1	<u>1,902</u> ***	28,4	<u>2,176</u> **	Independiente
	4,37x10 <sup>4</sup>	1,6	25,7	25,7	0,070	21,9	1,62	21,5	<u>1,810</u> *	Independiente
1:1	1,19x10 <sup>8</sup>	2000	83,3	90,6	<u>-3,867</u> ***	79,1	<u>1,901</u> *	75,7	<u>3,274</u> ***	Aditivo
	1,49x10 <sup>7</sup>	400	57,3	72,4	<u>-∞</u> ***	58,3	-0,271	54,5	1,032	Aditivo
	1,87x10 <sup>6</sup>	80	30	52,0	<u>-5,066</u> ***	40,5	-1,089	37,6	-0,085	Independiente
	2,33x10 <sup>5</sup>	16	28	36,2	<u>-2,938</u> ***	28,7	-0,188	26,7	0,569	Independiente
	2,92x10 <sup>4</sup>	3,2	22,3	26,1	-1,436	21,7	0,33	20,5	0,844	Independiente
1:3	5,97x10 <sup>7</sup>	3000	85,3	89,7	<u>-2,291</u> ***	77,3	<u>3,540</u> ***	71,7	<u>-∞</u> ***	Aditivo
	7,46x10 <sup>6</sup>	600	46,7	71,2	<u>-∞</u> ***	56,8	<u>-3,465</u> ***	52,0	<u>-1,787</u> *	Antagonístico
	9,33x10 <sup>5</sup>	120	31,3	51,0	<u>-∞</u> ***	39,7	<u>-2,937</u> ***	36,6	<u>-1,847</u> *	Antagonístico
	1,17x10 <sup>5</sup>	24	28	35,6	<u>-2,732</u> ***	28,3	-0,053	26,6	0,618	Aditivo
	1,46x10 <sup>4</sup>	4,8	27	25,8	0,546	21,6	<u>2,28</u> **	20,7	<u>2,669</u> ***	Independiente
Control	-	-	13,7	15,6	-0,857					

<sup>1</sup>  $P_{12} = P_1 + P_2 - (P_1 \times P_2)$ .

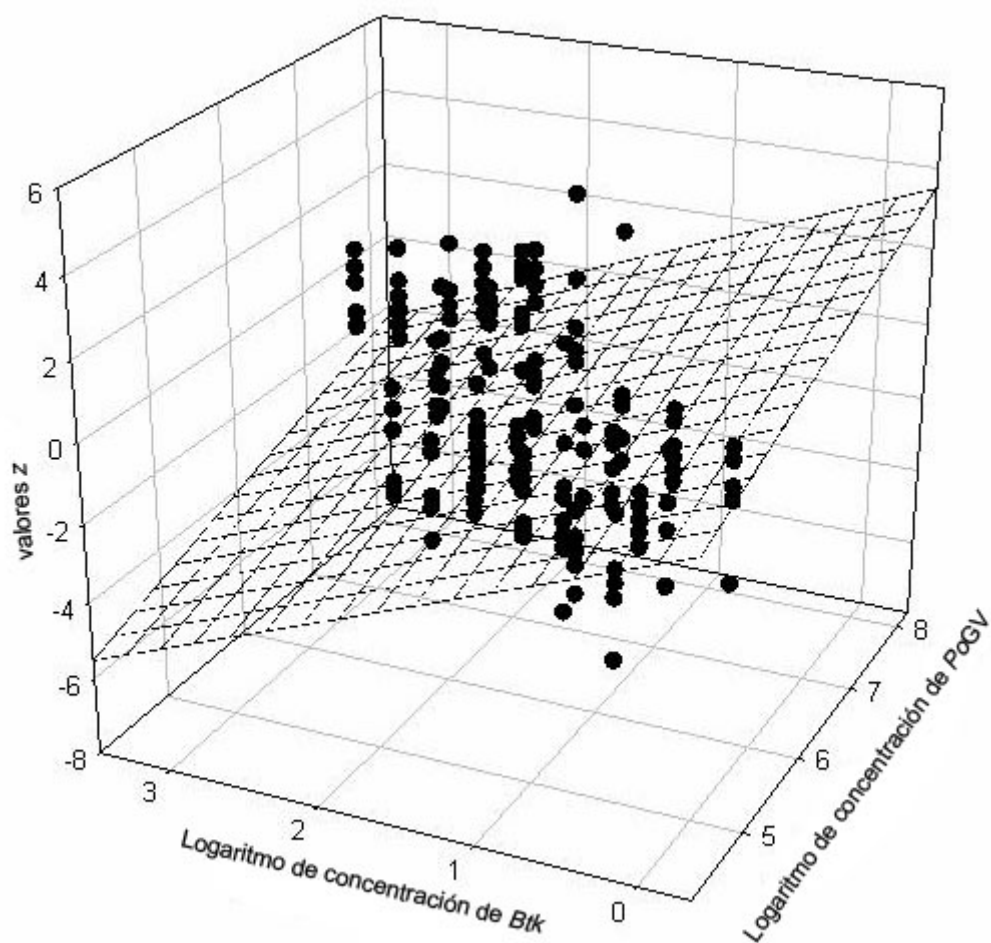
<sup>2</sup> Los dos componentes producen un efecto similar a la suma algebraica del efecto de ambos.

<sup>3</sup>  $P_{12} = \max(P_1; P_2)$ .

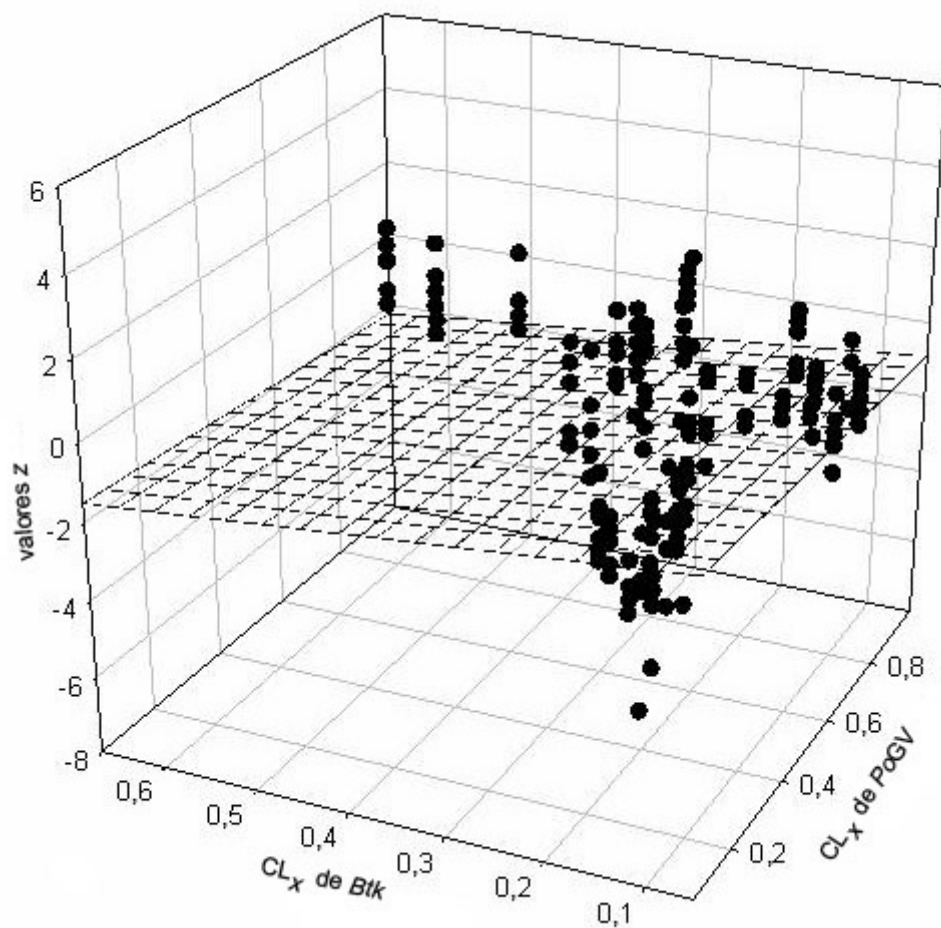
**Tabla 16.** Coeficientes de regresión obtenidos a partir de análisis de regresión múltiple entre las concentraciones letales ( $CL_x$ ) de *PoGV* y *Btk* en aplicaciones mixtas como variable independiente y valores-z obtenidos a partir de una prueba binominal comparando respuestas de mortalidad observadas y esperadas de larvas de *P. operculella* asumiendo interacción independiente de ambos patógenos.

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	T	P	Intervalo de confianza para B al 95%		Correlaciones		
	B	Error estándar				Límite inferior	Límite superior	Orden cero	Parcial	Semi parcial
(Constante)	-0,3023	0,1898		-1,5932	0,1129	-0,6768	0,0721			
<i>PoGV</i>	0,9546	0,6452	0,1635	1,4795	0,1408	-0,3187	2,2278	-0,2017	0,1105	0,1037
<i>Btk</i>	-4,4194	1,0342	-0,4723	-4,2732	0,0000	-6,4604	-2,3784	-0,3459	-0,3058	-0,2995

( $F = 24,19$ ,  $df = 1, 178$ ,  $p < 0,001$ )



**Figura 19. Regresión múltiple entre el logaritmo de las concentraciones de *PoGV* (gránulos/mL) y *Btk* (mg DiPel 2X/litro) como variables independientes en aplicaciones mixtas y los valores *z*.** Los valores *z* fueron obtenidos a partir de una prueba binominal comparando las respuestas de mortalidad observadas y esperadas en larvas de *P. operculella* asumiendo interacción independiente de ambos patógenos.



**Figura 20. Regresión múltiple entre concentraciones letales ( $CL_x$ ) de *PoGV* y *Btk* en aplicaciones mixtas como variables independientes y valores  $z$ . Los valores  $z$  se obtuvieron a partir de una prueba binominal comparando respuestas de mortalidad observadas y esperadas de larvas de *P. operculella* asumiendo interacción independiente de ambos patógenos.**

**Tabla 17.** Supervivencia de larvas de *P. operculella* y *S. tangolias* inoculadas en estadio de larva neonatal sobre tubérculos de papa tratados con fórmulas de *Btk*+ *PoGV* y *Btk* en polvo.

Tratamiento <sup>2</sup>	<i>P. operculella</i>				<i>S. tangolias</i>				Subgrupos <sup>1</sup>
	Promedio <sup>3</sup> (%)	Error estándar (%)	Intervalo de confianza 95%		Promedio <sup>3</sup> (%)	Error estándar (%)	Intervalo de confianza 95%		
			Limite inferior (%)	Limite superior (%)			Limite inferior (%)	Limite superior (%)	
<i>PoGV</i> + <i>Btk</i> en arena	5,7	2,5	0,6	10,7	1,0	3,1	-5,2	7,2	a
<i>PoGV</i> + <i>Btk</i> en talco	6,0	2,5	1,0	11,1	5,0	3,1	-1,2	11,2	a
<i>Btk</i> en talco	8,3	2,5	3,3	13,4	6,0	3,1	-0,2	12,2	a
Control talco	55,7	2,5	50,62	60,72	35,50	3,1	29,3	41,7	b
Control arena	66,7	2,5	61,6	71,7	57,5	3,1	51,3	63,7	c
Control sin aplicación	75,7	2,5	70,62	80,72	64,00	3,1	57,8	70,2	c

<sup>1</sup> Los subgrupos homogéneos (para los datos de las dos especies en conjunto) se muestran con las mismas letras (Prueba de Tukey,  $p > 0,05$ ).

<sup>2</sup> El número de larvas neonatas utilizados para cada fórmula fue  $n = 300$  de *P. operculella* y  $n = 200$  en *S. tangolias*. Con 6 y 4 repeticiones por fórmula. El bioensayo incluyó dos tratamientos control de material inerte (sin patógenos en fórmula); uno de polvo de arena y otro de talco, además de una prueba control sin aplicación alguna para ambas especies; donde el número de insectos,  $n$ , fue el mismo ya mencionado en los tratamientos con fórmula de patógenos para cada especie.

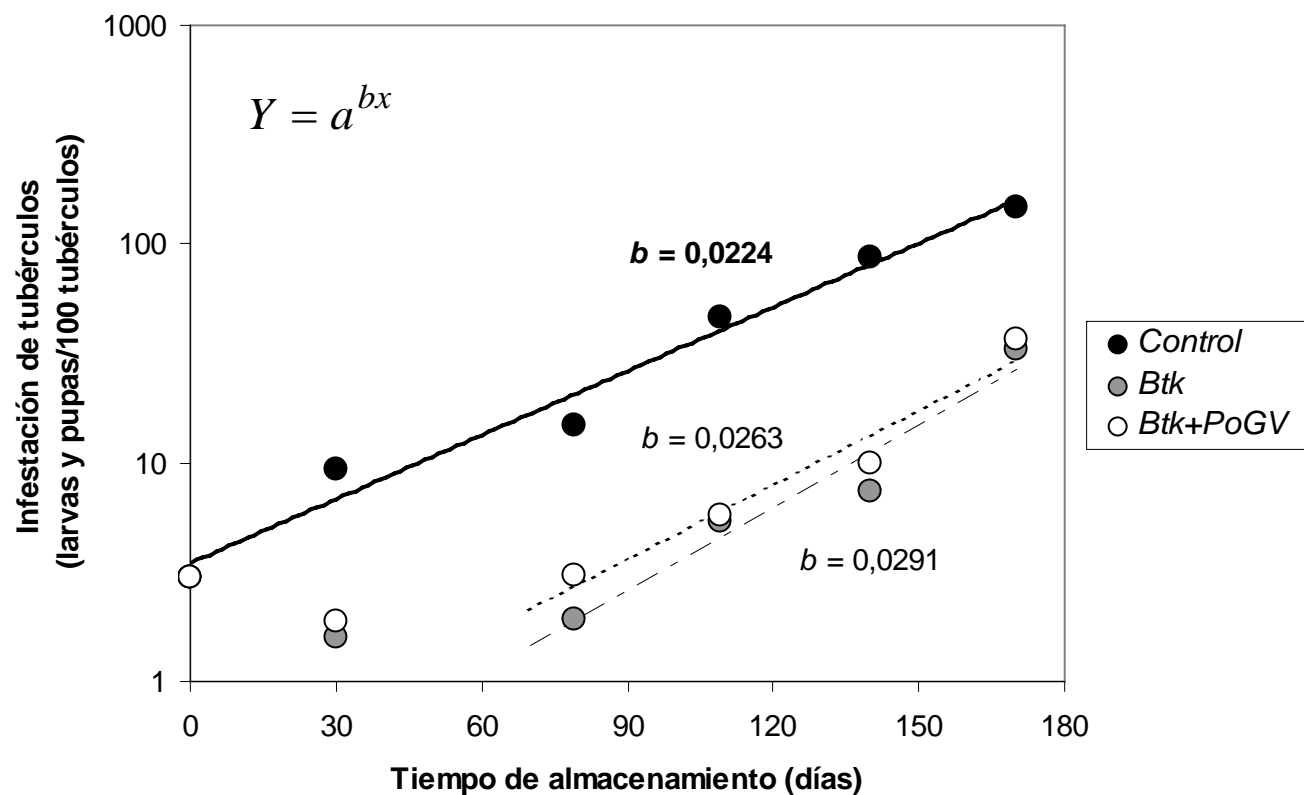


**Tabla 18.** Coeficientes de regresión para la curva de incremento exponencial encontrada entre el número de individuos de *S. tangolias* observados y tiempo de almacenamiento en 15 almacenes de agricultores productores de papa, utilizando un coeficiente común para el incremento, *b*, para todos los lugares.

Número de almacén	Intercepto estimado	Error estándar	P	Significancia
1	1,15	0,42	0,009	**
2	3,14	0,42	0,000	***
3	2,01	0,42	0,000	***
4	-0,52	0,42	0,224	
5	1,17	0,42	0,008	**
6	3,13	0,42	0,000	***
7	1,98	0,42	0,000	***
8	0,05	0,42	0,906	
9	-0,23	0,42	0,595	
10	0,47	0,42	0,275	
11	2,28	0,51	0,000	***
12	1,67	0,42	0,000	***
13	0,06	0,42	0,893	
14	1,47	0,42	0,001	***
15	1,01	0,62	0,106	
Pendiente común ( <i>b</i> )	0,0244	0,0022	< 0,001	***

Modelo encontrado:  $Y = a^{bx}$

Los interceptos representan los niveles iniciales de infestación antes del almacenamiento.



**Figura 21.** Incremento de infestación promedio por *S. tangolias* durante tiempo de almacenamiento de tubérculos de papa tratados con fórmulas individuales de *Btk* y combinadas de *PoGV* y *Btk* en talco. Dosis de aplicación 5g de fórmula por kg de papa. Un modelo exponencial fue adecuado para lo observado en los controles (línea continua). Tiempos teóricos de crecimiento exponencial de infestación (líneas discontinuas). Coeficientes de incremento relativo ( $b$ ).